Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. H. Raettig

DIE WIRKUNG DER ORALEN IMPFUNG MIT HITZEINAKTIVIERTEN SHIGELLEN IM DARMLIGATURTEST AM KANINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Tilman Gebhardt
aus Swakopmund, Südwestafrika

Berlin 1971

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Professor Dr. med. H. Raettig

DIE WIRKUNG DER ORALEN IMPFUNG MIT HITZEINAKTIVIERTEN SHIGELLEN IM DARMLIGATURTEST AM KANINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Tilman Gebhardt
aus Swakopmund, Südwestafrika

Berlin 1971

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

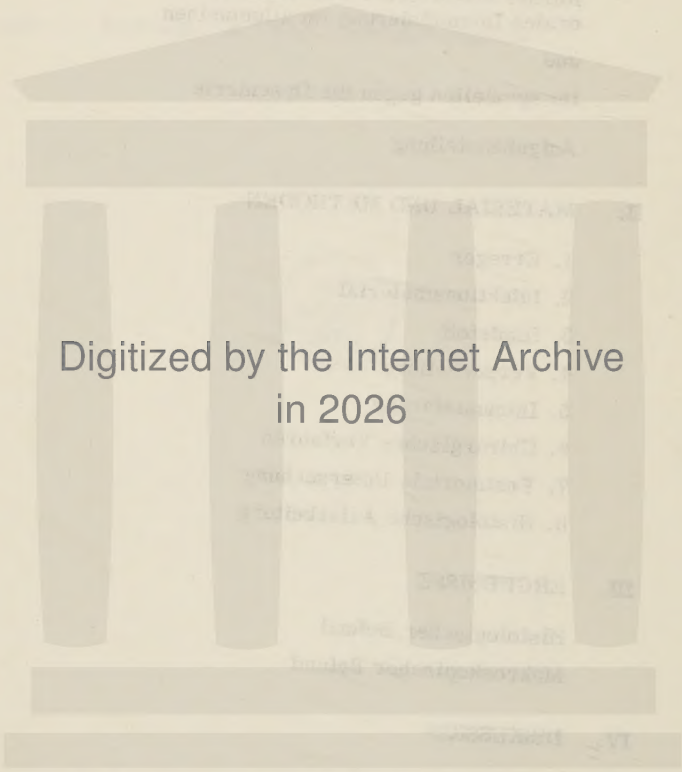
Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am 1.3.1971

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	Kurzer historischer Überblick zur oralen Immunisierung im allgemeinen	1
	und	
	im speziellen gegen die Dysenterie	4
	Aufgabenstellung	7
II.	MATERIAL UND METHODEN	10
	1. Erreger	10
	2. Infektionsmaterial	10
	3. Impfstoff	10
	4. Versuchstiere	11
	5. Immunisierung	11
	6. Chirurgisches Verfahren	11
	7. Postmortale Untersuchung	12
	8. Histologische Aufarbeitung	13
III.	ERGEBNISSE	14
	Histologischer Befund	15
	Makroskopischer Befund	27
IV.	DISKUSSION	34
V.	ZUSAMMENFASSUNG	47
VI.	LITERATUR	48



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0010

EINLEITUNG

Im Rahmen eines kurzen historischen Abrisses über die Entwicklung der oralen Immunisierung soll als erstes der experimentelle Nachweis EHRLICHs - 1891 - über die Toxintoleranzsteigerung durch orale Verfütterung steigender Dosen von Ricin und Abrin an Mäusen (16) und die in den darauffolgenden Jahren erfolgreich durchgeführten Versuche der oralen Schutzimpfung mit inaktivierten Erregern, darunter ZABOLOTNY - 1894 - mit V. cholerae (90), LÖFFLER - 1906 - mit S. typhi murium (51), SHIGA - 1908 - mit S. typhi (81) und DOPTER (15), CHVOSTEK (8) und SHIGA (81) - 1908 mit Sh. dysenteriae, Erwähnung finden.

Nach diesen grundlegenden Tierversuchen und den bald darauffolgenden zahlreichen Bestätigungen der Wirksamkeit oraler Immunisierung wurden nach dem I. Weltkriege, insbesondere in den 20er Jahren, umfangreiche Feldversuche zur Bekämpfung von Typhus-, Paratyphus-, Ruhr- und Choleraepidemien erfolgreich durchgeführt und durch die statistisch signifikante Senkung der Morbidität die Wirksamkeit der oralen Immunisierung mit inaktivierten Bakterien bewiesen.
Daß schließlich in den 30er Jahren, durch die fast ausnahmslose Anwendung der parenteralen Immunisierung, dieser gegenüber der oralen der eindeutige Vorzug gegeben wurde, hat seine Begründung nicht in einer empirisch belegten Überlegenheit der ersteren, sondern ist eng verbunden mit dem Dualismus zwischen der sogenannten "Deutschen -" und der "Französischen" Schule. Letztere, basierend auf der Phagozytoselehre METSCHNIKOFFs, die der zellulären Reaktion als wichtigsten Immunitätsfaktor die primäre Bedeutung zuerkannte (54), gipfelte und kollidierte schließlich mit der überspitzten Postulierung ihres profiliertesten Vertreters, BESREDKA, über die alleinig bedeutsame, durch eine lokale Immunisierung induzierte, lokale Immunität (3). -
Die rein empirisch nachgewiesene Wirksamkeit der oralen Immunisierung hat theoretisch nicht nachvollzogen werden können, da bei der oralen Schutzimpfung auch eine allgemeine Immunität - direkt nachweis-

bar durch stark wechselnde Antikörpertiter im Serum - beobachtet wurde; eine Resorption bzw. Persorption großmolekularer Antigene durch die Darmwand - sog. Herbsteffekt - wurde für unwahrscheinlich gehalten.

Demgegenüber hatte die durch die "Deutsche Schule" - darunter die Begründer von BEHRING, PFEIFFER und BÜCHNER - vorangetriebene parenterale Immunisierungsmethode experimentell fundiertere Ergebnisse gezeitigt; auch schien hier ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Serumantikörpertiter und dem Infektionsschutz gegeben. Die Methode erschien demnach theoretisch plausibel, so daß sie schließlich um 1930 auf breiter, internationaler Ebene Anwendung fand, und so in der Folgezeit der weiteren Erforschung der Wirkungsmechanismen oraler Immunisierung kaum nennenswerte Bedeutung mehr zuteil wurde.

Neben der Wiederentdeckung der Kopro-Antikörper durch BURROWS - 1947 - (4-6) im Rahmen immunologischer Versuche mit V. cholerae und neben der Entwicklung der oralen Poliomyelitis-Impfstoffe mit abgeschwächten lebenden Viren durch COX und SABIN in den 50er Jahren, ist es ein besonderes Verdienst RAETTIGs, die orale Immunisierung neu aufgegriffen und die Diskussion darum belebt zu haben. Seine während und im Anschluß an den II. Weltkrieg gemachten Beobachtungen, insbesondere im Verlauf der pandemischen Ausbreitung des Typhus 1945/46, veranlaßten ihn zur Anwendung der oralen Schutzimpfung im Rahmen großangelegter Feldversuche, deren Ergebnisse (59)-aufgrund der signifikanten Senkung der Morbidität und Letalität - eindeutig zugunsten dieser Methode sprachen.

RAETTIG und Mitarbeiter untersuchten in der Folgezeit die Wirkung oraler Immunisierung am Modell von Mäuseepidemien - veröffentlicht in zahlreichen, fortgesetzten Mitteilungen über die "orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen" - und haben damit neue Gesichtspunkte in der Beziehung zwischen humoraler und lokaler Immunität aufgewiesen. - Die Persorption

großmolekularer Antigene aus dem Darm - Phagen und Viren (61), radiomarkierter S. typhi murium (55) und Candida albicans (35) - die nach wenigen Minuten im Kreislauf nachgewiesen wurden, und die Sekretion derselben über die Schleimhäute des Respirations- und Digestionstraktes nach parenteraler Injektion (55, 79), beweisen einen Kreislauf des Antigens, der einen innigen Kontakt mit den immunkompetenten Zellen des Organismus gewährleistet. Neben der Bildung lokaler Antikörper (73, 74, 78) kommt es auch zur Ausbildung einer humoralen Immunität (70, 73, 74), die sich nicht in der Höhe der Serumantikörpertiter, sondern vielmehr an der Schnelligkeit der Antikörperbildung nach neuerlichem Antigenreiz messen läßt (50). Auch unterscheidet sich die Sekundär- und Hyperimmunantwort nach oraler Immunisierung bei erneuter Gabe von Antigen, ob oral oder parenteral verabreicht, nicht von der nach parenteraler Immunisierung (48). Der durch die orale Immunisierung erzielte humorale und lokale Impfschutz hat sich experimentell an der Maus durch die homologe intraperitoneale Infektion (44, 50, 71) und durch die orale Belastung mit enteropathogenen Mikroorganismen (62) signifikant belegen lassen. Bei letzterer Versuchsanordnung - orale Immunisierung und orale Belastung - kam des weiteren neben einer spezifischen eine zusätzlich unspezifische Immunität gegen Verwandtes (65) sowie gegen völlig fremdes Antigen (66) zur Beobachtung.

Der Anwendungsbereich der oralen Immunprophylaxe schließt demnach die lokalen infektiösen Darmerkrankungen wie Ruhr, Cholera, Salmonellosen und Colidyspepsien als auch die zyklischen Infektionskrankheiten wie Typhus, Paratyphus und die Poliomyelitis ein, für die der Darm die Eintrittspforte und somit die erste Immunschranke darstellt. Und gerade dieser Umstand gewährt eine Senkung der Morbidität gegenüber der vorwiegend humoral wirksamen parenteralen Immunprophylaxe, deren Wirksamkeit sich auf eine Unterdrückung des Generalisationsstadiums, also auf einen abgeschwächten Krankheitsverlauf beschränkt. RAETTIG weist wiederholt auf die Vorteile des oral erzielten Impfschutzes hin (60, 63, 64, 67, 72) und empfiehlt auch im Zeitalter der

Antibioticis eine breitere Anwendung, da der Einsatz letzterer ja bereits eine Erkrankung zur Voraussetzung hat. Die Vorzüge lassen sich kurz zusammenfassen:

Die orale Immunisierung stellt erstens, wie bereits ausgeführt, eine wirkliche Prophylaxe für Erkrankungen des Intestinaltraktes bzw. für Krankheiten, deren Erreger über den Darm Eintritt in den Organismus finden, dar.

Zweitens erzeugt sie eine lokale und humorale Immunität, die weniger spezifisch ist, dafür aber eine größere Breitenwirkung gegen verwandtes Antigen entfaltet.

Drittens gewährt sie bereits nach Stunden einen nachweisbaren Impfschutz und unterscheidet sich damit deutlich von der parenteralen Immunisierung.

Schließlich hat sie sich als allgemein gut verträglich erwiesen; Unverträglichkeit, Kontraindikationen und Provokationen sind nicht beschrieben worden. Deshalb erweist sie sich insbesondere in Katastrophenfällen als geeignet, zumal der Organisationsaufwand relativ gering, ärztlich vorgebildetes Personal nicht obligat und die Gewähr eines schnell einsetzenden Impfschutzes gegeben ist. Des weiteren bietet die Anwendungsform sowie die Lagerfähigkeit des Impfstoffes einen deutlichen Vorteil gegenüber der parenteralen Impftechnik.

Im Rahmen der im Robert Koch-Institut erarbeiteten Grundlagen zu den bereits im Handel erhältlichen Trockenimpfstoffen mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen, deren Verwendung sich auf die Bekämpfung von Epidemien sowie als Prophylaxe für Reisen in endemische Länder erstreckt, ist die Frage nach der Möglichkeit einer oralen Immunisierung gegen Erkrankungen an bakterieller Ruhr von aktuellem Interesse.

Für die Immunprophylaxe der Dysenterie ist von Bedeutung, daß die Erkrankungen an der hochtoxischen Shiga-Kurse-Ruhr seit dem II. Weltkrieg in Mitteleuropa und Nordamerika nicht mehr und im übri-

gen nur noch gelegentlich anzutreffen sind; dagegen haben die klinisch leichter verlaufenden Formen der Erkrankung an Flexner- und Sonne-E-Ruhr keine wesentliche Änderung hinsichtlich der Morbiditätsziffer erfahren. Für diese Erregergruppe sind immunprophylaktische Überlegungen somit weiterhin relevant.

Aus einem geschichtlichen Überblick über Versuche zur oralen Schutzimpfung gegen die Dysenterie (60, 68, 52) ergibt sich eine auffallende Konformität hinsichtlich der Ergebnisse der zahlreich durchgeführten Feldversuche mit homologen und polyvalenten Impfstoffen (1, 40, 41, 37, 56, 88), die sich aufgrund der Verträglichkeit und des erzielten Impfschutzes eindeutig zugunsten dieser Form der Immunprophylaxe aussprechen. Dagegen divergieren die Ergebnisse der tierexperimentellen Versuche an Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen zum Teil erheblich, die wohl zu einem gewissen Maße durch unterschiedliche Versuchsanordnungen - orale, intravenöse und intraperitoneale Belastung nach unterschiedlichem oralen Impfrhythmus - erklärt werden können. Doch ergab sich folgende Übereinstimmung:
a) Es besteht kein wesentlicher Unterschied zwischen den allein endotoxinbildenden Shigellatypen hinsichtlich der Wirkung oraler Immunisierung bei nachfolgender homologer Belastung (58).
b) Die orale Immunisierung erweist sich nur bei mehrmaliger Verabfolgung relativ hoher Antigendosen als wirksam (27, 38, 52, 57, 73).
c) Es wurde kein signifikanter Unterschied in der erzielten Immunität durch Anwendung von lebend- oder hitzeinaktiviertem Impfstoff beobachtet (9, 75).

In den letzten Jahren haben vornehmlich FORMAL und LABREC sowie RAUSS und KETYI über tierexperimentelle Versuche zur Wirkung der oralen Immunisierung und zur Klärung der Pathogenese der bakteriellen Ruhr anhand oraler Belastung mit virulenten Shigellen - meist Sh. flexneri - berichtet: Die erzielte Immunität ist typenspezifisch und allein abhängig von dem antigenen Wert des Impfstoffes (29, 75) und ist, vorausgesetzt, daß bei der oralen Immunisierung größere Men-

gen Antigen in mehrfachen Stimuli verabfolgt werden, der parenteralen gleichzusetzen (75). Dabei gelten die bei beiden Impfmethoden auftretenden Serum- und Kopro-Antikörper als gleichwertige Faktoren hinsichtlich der erzielten Immunität, entscheidend ist allein der hohe Gehalt an Antikörpern im Darm (75, 76); das gilt sowohl für die aktive, als auch die passive Immunisierung.

Um überhaupt eine Darminfektion am Meerschweinchen (21, 22, 24, 25) oder die symptomlose Ausscheidung von Shigellen bei der Maus (73-75) durch die orale Infektion mit virulenten Dysenteriebakterien zu erzielen, mußten durch Vorbehandlungen erst die entsprechenden Voraussetzungen geschaffen werden. Die natürliche Coliflora (24, 31, 74) und die Motilität des Dünndarms (25) stellten einen Schutz und natürlichen Abwehrmechanismus dar, der entweder durch die Anwendung von Streptomycin oder die Vorbehandlung mit Tetrachlorkohlenstoff und Opium durchbrochen werden mußte. Bei Rhesusaffen hingegen war spontan mit der Verfütterung von virulenten Shigellen eine regelrechte Dysenterie zu provozieren (27-29).

Für die Pathogenese der bakteriellen Ruhr scheint die Fähigkeit des Erregers bis in die Lamina propria des Darmes einzudringen und dort zu verweilen, d. h. sich zu vermehren, von entscheidender Bedeutung zu sein (17, 26-29, 46, 47, 75, 83). Virulente Sh. flexneri-Bakterien, die beim Meerschweinchen und Affen die für die Dysenterie typischen Darmläsionen hervorriefen, besaßen diese Fähigkeit gegenüber partiell virulenten Mutanten - z. B. E. coli-Sh. flex.-Mischstamm - die noch ein Penetrationsvermögen aber keine Vermehrungsfähigkeit mehr in vivo besaßen und auch gegenüber völlig avirulenten Mutanten, die keine dieser Merkmale aufwiesen (47, 77). Hinsichtlich einer wirksamen Immunität korrespondieren diese Ergebnisse mit der Beobachtung, daß bei oral immunisierten Rhesusaffen virulente Sh. flexneri nicht in die Darmwand eindrangen (27-29). Ferner zeigt sich in den Mäuseversuchen, daß die Ausscheidung von Shigellen, d. h. die Vermehrung in vivo, verhindert wurde (73, 75).

Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit habe ich in tierexperimentellen Untersuchungen am Kaninchen - Versuche über die Wirksamkeit der oralen Immunisierung gegen die Dysenterie - einen nicht sehr gebräuchlichen Belastungsmodus gewählt, auf dessen Problematik in der Diskussion anhand einer Besprechung vorangegangener Arbeiten verschiedener Autoren und anhand der hier damit gezeitigten Ergebnisse näher eingegangen werden soll.

Die diesen Versuchen zugrunde liegende Technik, die erstmals von DE und CHATTERJE - 1953 - beschrieben wurde (11), ist in den darauffolgenden Jahren zunehmend von weiteren Autoren aufgegriffen und vielfach variiert worden, um einen Beitrag zur Klärung der Pathogenese lokaler intestinaler Infektionskrankheiten zu leisten, zumal in diesem Modell, im Vergleich zur humanen Enteritis, weitgehend reproduzierbare Ergebnisse offensichtlich wurden. Diese dann häufig als De-Test bezeichnete Methode beruht auf der Injektion enteropathogener Keimsuspensionen in ligierte Segmente des Dünndarms lebender Kaninchen und scheint anhand der folgenden Darlegungen sich als besonders geeignet anzubieten:

1.) Das der Enteritis zugrunde liegende charakteristische anatomisch-pathologische Geschehen konnte lediglich durch Belastungsversuche mit enteropathogenen Erregern hervorgerufen werden.

2.) Erreger, die sich bei einer Verabreichung per os für das Kaninchen als apathogen erweisen würden, rufen in diesem Modell an ihrem natürlichen Einwirkungsort eine der Enteritis gleichende entzündliche Reaktion hervor.

3.) Pathogenes und apathogenes Verhalten verschiedener Serotypen eines oder mehrerer Bakterienstämme wird mithilfe dieser Technik direkt offensichtlich.

4.) Es werden in diesem geschlossenen System quantitative Versuche,

d. h. Belastung mit einer bestimmten Anzahl lebender Erreger, und Untersuchungen über ihre Vermehrungs- und Invasionsfähigkeit möglich.

5.) Die Entwicklungsdauer einer Entzündung - von den ersten Anzeichen bis hin zur vollen Ausbildung derselben - wird durch die hohe Anzahl der mit der Darmwand kontaktierenden Bakterien in diesem geschlossenen System verkürzt, d. h. das Ausmaß der Entzündung wird in Bezug zur Zeit unweigerlich vergrößert.

Versuche, die Wirkung oraler Immunisierung anhand dieses Belastungsmodus zu demonstrieren, sind bisher lediglich von FRETER (33) im Rahmen vergleichender Untersuchungen über den Immunmechanismus in verschiedenen experimentellen Modellen der Cholera unternommen worden. Diese Ergebnisse haben gezeigt, daß sich durch einen oral erzielten Impfschutz an Kaninchen die Häufigkeit des Auftretens einer exudativen Enteropathie gegenüber Kontrolltieren signifikant senken ließ. - Dagegen hat YAHAGI (89) in Versuchen über eine parenterale Immunisierung gegen enteritis-erregende Bakterien - darunter auch Sh. flexneri - nach pathologisch-anatomischen Kriterien an diesem Modell keine Wirkung aufzeigen können.

Durch eine orale Impfung mit hitzeinaktivierten Shigellen und durch nachfolgende homologe Infektion soll an diesem Modell nun folgendes untersucht werden:

1.) Inwieweit wird sich ein Impfschutz überhaupt nachweisen lassen?

2.) Wird am 4. Tage bereits schon - und am 25. Tage nach abgeschlossener Immunisierung noch ein Impfschutz vorhanden sein?

3.) Inwiefern deckt sich der histologische mit dem makroskopischen Befund und inwieweit besteht ein Kausalzusammenhang zwischen beiden?

4.) Wie empfindlich erweist sich dieser Belastungsmodus gegenüber der Infektion mit unterschiedlicher Zahl virulenter Erreger?

5.) Läßt sich auch mit hitzeinaktivierten Shigellen ein entzündliches Geschehen provozieren?

6.) Inwiefern eignet sich dieser Belastungsmodus überhaupt, um die Wirkung einer oralen Impfung zu demonstrieren?

MATERIAL UND METHODEN

1. Erreger

Zur Immunisierung und Infektion wurden folgende Serotypen Sh. flexneri, die als Stichkulturen im Robert Koch-Institut vorliegen, angewendet:

a) Shigella flexneri Typ 1b - Gruppennummer 6716
b) Shigella flexneri Typ 2a - Gruppennummer 9595
c) Shigella flexneri Typ 2a - Gruppennummer 366, 69

2. Infektionsmaterial

Zur Herstellung der Keimsuspensionen wurden die oben erwähnten Serotypen auf Brühe verimpft und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. 5 ml dieser Kultur wurden auf große Agarplatten von 22 cm Durchmesser verimpft und für weitere 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach erfolgter Probe-Agglutination zu Identitätskontrolle wurde der Bakterienrasen ohne Zugabe von Flüssigkeit mit Hilfe von sterilen Glasspateln vom Agar abgelöst und abpipettiert. Nach der Keimzählung wurde die Kulturaufschwemmung mit Phosphat gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (pH 7, 2) auf ihren endgültigen Titer von 10^9 Keimen ml eingestellt, von dem wiederum für einen Teil der Versuche über eine Verdünnungsreihe Titer von 10^8 - 10^7 - 10^6 - 10^5 Keimen ml hergestellt wurden.

3. Impfstoff

Zur Bereitung des Impfstoffes wurde die Bakterienaufschwemmung von 10^9 Keimen/ml des jeweiligen Sh. flexneri Serotype für 5 Minuten bei 100°C hitzeinaktiviert. Zur Sterilitätsprüfung wurden 2 ml des Impfstoffes auf Brühe verimpft und 10 Tage bei 37°C bebrütet. - Der fertige Impfstoff wurde bei 4°C aufbewahrt.

4. Versuchstiere

Für alle Versuche wurden Kaninchen der Neuseeland-Rasse verwendet. Tiere beiderlei Geschlechts, mit einem Lebendgewicht von 1,6 - 3,5 Kg, wurden einzeln in Käfigen gehalten und mit Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser versorgt. Die Nahrung wurde 24 Stunden vor dem chirurgischen Eingriff, das Wasser post operationem entzogen.

5. Immunisierung

Die zu immunisierenden Kaninchen erhielten an 2 x 5 aufeinander folgenden Tagen mit einem Intervall von 2 Tagen jeweils 2 ml des Impfstoffes per Sonde oral verabreicht. Zur Vermeidung von Verletzungen trug die gebogene Schlundsonde an der Spitze eine Olive. Die totale Dosis pro Tier betrug demnach 20 ml des Impfstoffes. Die Immunisierung wurde von allen Tieren ohne irgendwelche Krankheitserscheinungen vertragen.

6. Chirurgisches Verfahren

Kaninchen, denen die Nahrung vor 24 Stunden entzogen worden war, erhielten als Praemedikation 0,5 ml Combelen^{R} i. m. 2 Stunden vor Beginn des chirurgischen Eingriffes. Die Bauchdecke des Kaninchens wurde enthaart und mit 60 %igen Isopropylalkohol desinfiziert. Unter vorsichtig gehandhabter Äthernarkose wurde mit einem 5 cm langen Medianschnitt über dem Mittelbauch das Abdomen eröffnet. Das in der linken Abdominalhöhle befindliche Dünndarmkonvolut wurde unter die Schnittöffnung geschoben und nach Identifikation des oberen Jejunums dieser Darmanteil vorsichtig hervorgezogen. Etwa 40 cm unterhalb des Jejunalbeginns wurde mittels Catgut eine erste Darmligatur - unter behutsamer Meidung der dem Darm enganliegenden Mesenterialgefäßarkaden - gesetzt. Mittels weiterer Ligaturen wurden 15 cm lange geschlossene Darmsegmente alternierend mit 10 cm langen Zwischenstücken analwärts geschaffen. Die Zwischenstücke dienten lediglich zur Isolierung der einzelnen Darmsegmente voneinander, um so ein mögli-

ches Übergreifen einer entzündlichen Reaktion auf nachbarliche Segmente zu vermeiden.

Im ersten Teil der Versuche wurden je 3 Darmsegmente mit jeweils 2 Zwischenstücken, im zweiten Teil 5 Segmente mit jeweils 4 Zwischenstücken geschaffen. Die ligierten Darmabschnitte wurden im Anschluß daran mittels einer Recordspritze und einer 22er Kanüle mit jeweils 1,5ml des entsprechenden Agens beschickt; d. h. in dieser Reihenfolge:

1. Teil der Versuche (s. Abb. 9):
   a) 1,5 ml x 10^9 virulente Sh. flex./ml
   b) 1,5 ml phys. Kochsalzlösung
   c) 1,5 ml x 10^9 hitzeinaktivierte Sh. flex./ml.

2. Teil der Versuche (s. Abb. 10):
   a) 1,5 ml x 10^8 virulente Sh. flexneri/ml
   b) 1,5 ml x 10^7 virulente Sh. flexneri/ml
   c) 1,5 ml x 10^6 virulente Sh. flexneri/ml
   d) 1,5 ml x 10^5 virulente Sh. flexneri/ml
   e) 1,5 ml phys. Kochsalzlösung.

Im Anschluß daran wurden die Darmschlingen vorsichtig in die Abdominalhöhle zurückverlagert und durch Schütteln in eine natürliche Position gebracht. Das Abdomen wurde zweischichtig durch zwei fortlaufende Nähte verschlossen und die Operationswunde mit einem Mastix-Mull-Verband abgedeckt. Der chirurgische Eingriff dauerte im Schnitt 15 - 20 Minuten. Der überwiegende Teil der Kaninchen war sofort hockfähig. 24 Stunden post operationem wurden die Tiere mittels einer Injektion von 10 ccm Luft in die Ohrvene durch die konsekutive Luftembolie getötet.

7. Postmortale Untersuchung

Die Untersuchung erfolgte sofort im Anschluß an die Tötung. Das Abdomen wurde wieder eröffnet und der gesamte, betroffene Darmabschnitt mit genügend langem proximal und distal davon gelegenem An-

teil in einem Stück herausgenommen und makroskopisch betrachtet. Von jedem Darmsegment wurden je 2 x 1 cm lange Gewebsstücke entnommen und zwecks histologischer Aufarbeitung in 10 %igem Formalin fixiert.

8. Histologische Aufarbeitung

Von den fixierten Gewebsstücken wurden im üblichen Verfahren - über die Einbettung in gemischtem Paraffin - histologische Schnitte angefertigt und diese nach EHRLICH's Haematoxilin-Eosin-Färbung angefärbt.

ERGEBNISSE

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche, der Belastung ligierter Segmente des Dünndarms mit virulenten Shigellen beim immunisierten und nicht immunisierten Kaninchen, sind nach dem zeitlichen Abstand der Belastung nach abgeschlossener oraler Immunisierung in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe I : Belastung am 4. Tag
Gruppe II : Belastung am 10. Tag
Gruppe III: Belastung am 25. Tag

nach abgeschlossener oraler Immunisierung.

Im Verlaufe der ersten Versuche hat es sich als erforderlich erwiesen, Kontrolltiere streng parallel zu jeder Gruppe immunisierter Kaninchen zu belasten, d. h. am gleichen Operationstag neben immunisierten Tieren auch Kontrollen intestinal zu infizieren, um möglichst zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen. Die von ARM und FLOYD (2) erwähnten und eigens bestätigten Beobachtungen der unberechenbaren Virulenzänderung der Shigellen zwingen zu dieser Maßnahme, auch fanden dadurch jahreszeitliche und mögliche meteorologische Einflüsse weitgehende Berücksichtigung. - Die Kontrollen erfahren demzufolge, wie aus den Tabellen 2, 4 und 6 ersichtlich wird, eine Zuordnung zu der entsprechenden Gruppe immunisierter Kaninchen.

Von den insgesamt 56 Kaninchen, die der operativen Technik der Darmligierung unterzogen wurden, sind die Ergebnisse von 5 immunisierten Tieren und 6 Kontrollen eliminiert worden; dies betraf eine Versuchsreihe, an der sich aufgrund eines Virulenzverlustes des verwendeten Shigellastammes, keine erwähnenswerten Entzündungserscheinungen haben nachweisen lassen. Dieser beobachtete Virulenzverlust gab dann auch Anlaß zur Verwendung verschiedener Sh. flexneri Serotypen.

Im Laufe der Versuche ist das chirurgische Verfahren sowie der Infektionsmodus abgeändert worden. Bei den zeitlich zuerst durchgeführten Versuchen - Gruppe II - wurde in drei Darmsegmente eines je-

den Kaninchens nacheinander 1,5 ml x 10^9 virulente Sh. flex./ml, phys. Kochsalzlösung und hitzeinaktivierte Shigellen injiziert. Da in der darauffolgenden Versuchsreihe - Gruppe I - bei diesem Belastungsmodus anhand des makroskopischen Befundes keine Impfwirkung deutlich wurde, wurde die Zahl der ligierten Darmabschnitte auf fünf erweitert, um mit einer Verdünnungsreihe von 10^8-10^7-10^6-10^5 virulenter Shigellen/ml einen empfindlicheren Nachweis führen zu können. Auf eine zusätzliche Injektion inaktivierter Erreger wurde hier verzichtet. Dieser Infektionsmodus wurde dann auch auf die Gruppe III übertragen.

Die Injektion von phys. Kochsalzlösung in ein Darmsegment eines jeden Versuchstieres sollte als Kontrolle gegenüber den mit lebenden und mit inaktivierten Keimen inokulierten Darmabschnitten dienen.

Histologischer Befund

Zur histologischen Beurteilung und Auswertung der jeweilig entzündlichen Reaktion, die in unterschiedlichem Ausmaße an fast jedem der ligierten Darmabschnitte zur Beobachtung kam, fanden folgende Kriterien Anwendung:

Normal: (Um diesen Begriff des "Normalen" zu konstituieren, wurden mehrere Gewebsstücke aus Teilen des Jejunums und Ileums zweier Kaninchen entnommen, die unter gleichen Versuchsbedingungen gehalten, an denen jedoch kein vorangegangener operativer Eingriff vorgenommen worden war.)

Im Darmlumen wird in geringem Maße Exudat, bestehend aus Schleim und vereinzelten Zelltrümmern angetroffen. Die Villi sind schlank und mit intaktem Zylinderepithel bedeckt. - Blut und Lymphgefäße der Lamina propria sind nicht gestaut und dilatiert, polymorphkernige Leukozyten sind nur selten, und wenn in verschwindendem Ausmaße anzutreffen. Die Submucosa ist kompakt, die Gefäße sind nicht erweitert oder gestaut (s. Abb. 1).

Leicht: Dieser Befund unterscheidet sich vom "Normalen" insofern, als daß die Villi durch ein interstitielles Oedem und erweiterte Lymphgefäße eine Verbreiterung erfahren. Das bedeckende Zylinderepithel ist vollständig intakt. Erweiterte Blutgefäße sind gelegentlich vorhanden; polymorphkernige Leukozyten sind ganz vereinzelt in dem die Gefäße umgebenden Bindegewebe anzutreffen (s. Abb. 2).

Mittel: Im Darmlumen findet sich in wechselndem Ausmaß Exudat mit zahlreichen Zelltrümmern und einzelnen Leukozyten sowie gelegentlich Erythrozyten. Die Mehrzahl der Villi ist mit intaktem Epithel bedeckt; an verschiedenen Stellen ist die Kontinuität dieses Epithels jedoch unterbrochen und beginnende Erosionen werden beobachtet. Die Villi sind durch Ansammlung z. T. eosinophiler Flüssigkeit innerhalb des Bindegewebes und der Lymphgefäße meist erheblich verbreitert und z. T. klobig deformiert und haben eine Reduktion ihrer ursprünglichen Höhe erfahren. Eine große Anzahl polymorphkerniger Leukozyten ist im Bindegewebe der Lamina propria - vorwiegend im Zottenstroma anwesend (s. Abb. 4). Gefäßstauung, Oedem sowie eine polymorphzellige Infiltration wird in wechselndem Umfang auch in der Submucosa angetroffen.

Schwer: Eine weitgehende Zerstörung der Gewebsstruktur sowie die Ausbildung diphtheroider Pseudomembranen sind hier das auffälligste Merkmal. Die Schleimhaut weist erhebliche Ulcerationen auf - ein großer Teil der Villi ist destruiert und den Erosionen zum Opfer gefallen. Es finden sich zahlreiche Leukozyten im Darmlumen in der Mucosa und Submucosa. Die Darmwand hat insgesamt - wohl z. T. bedingt durch die erhebliche Dehnung infolge reichlicher Ansammlung von Exudat im Lumen - eine deutliche Verschmälerung erfahren (s. Abb. 5).

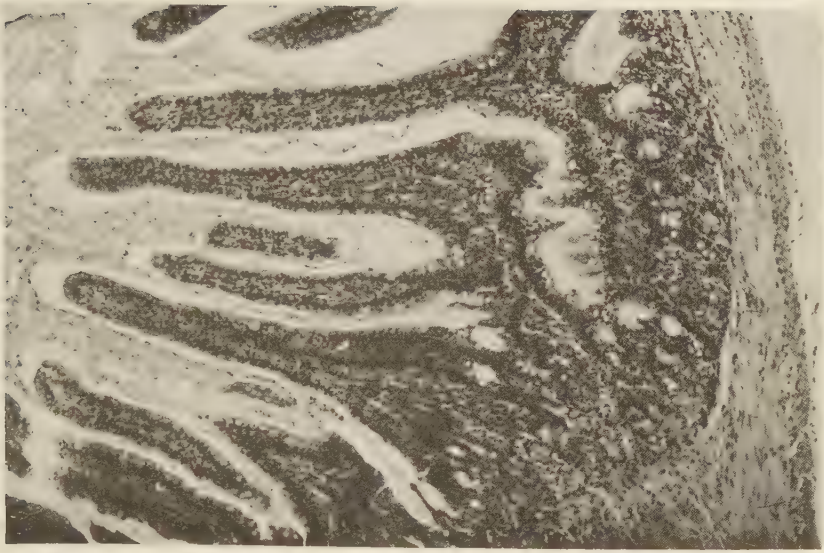


Abb. 1 'Normal' Befund. 100fache Vergrößerung.

Abb. 2 'Leichter' Befund. Die Zotten sind durch ein interstitielles Oedem verbreitert. Vereinzelte Leukozyten in der Submucosa (L). 100fache Vergrößerung

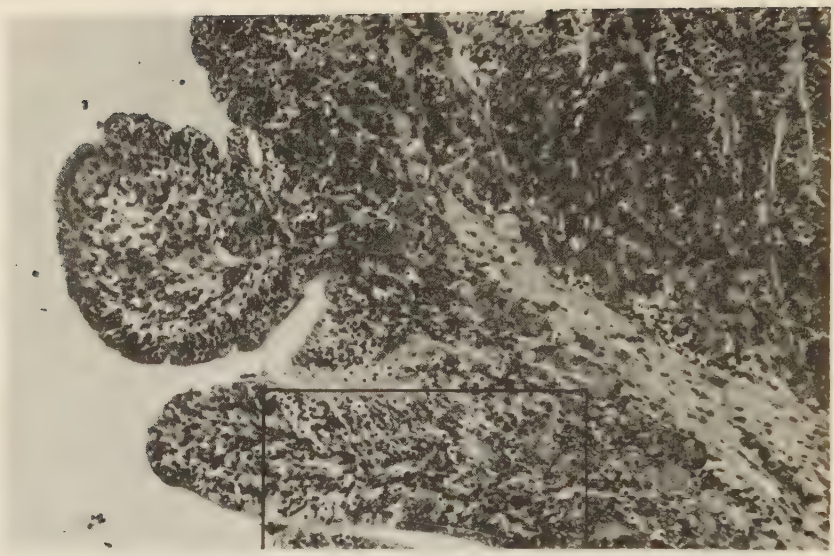


Abb. 3 'Mittlerer' Befund. Die Villi sind erheblich verbreitert und deformiert und weisen eine massive leukozytäre Infiltration auf. 125fache Vergrößerung.

Abb. 4 'Mittlerer' Befund. Ausschnitt aus Abb. 3. 325fache Vergrößerung.

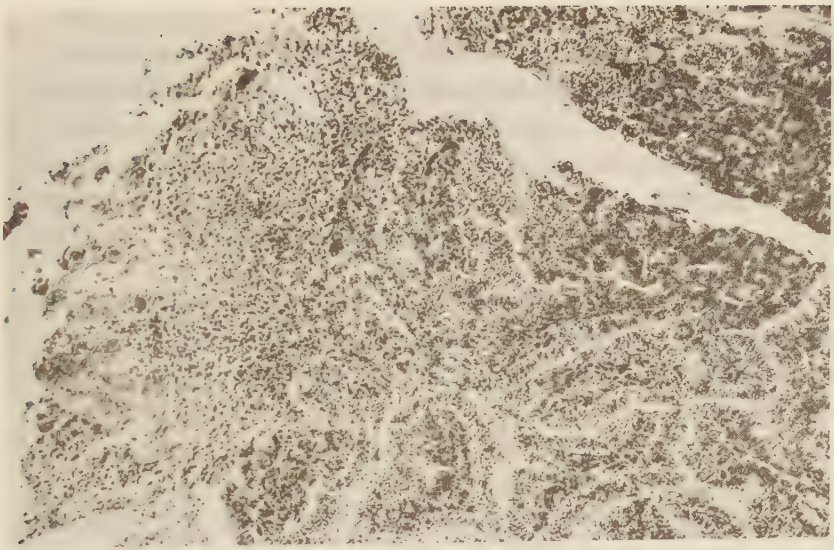


Abb. 5 'Schwerer' Befund. Pseudomembranöse Entzündung unter weitgehender Zerstörung der Zottenstruktur. 100fache Vergrößerung.

Abb. 6 'Sehr schwerer' Befund. Fortschreitende Nekrose der Mucosa und Submucosa. 100fache Vergrößerung.

Sehr schwer: Dieser Grad betrifft Befunde, in denen die Gewebsdestruktion so weit fortgeschritten ist, daß die Mucosa fast vollständig erodiert ist. Die ausgedehnten, z. T. hämorrhagischen Gewebsnekrosen, die selbst die Submucosa mit einbeziehen, stehen hier im Vordergrund. Eine polymorphkernige leukozytäre Infiltration ist hier nicht mehr nachzuweisen (s. Abb. 6).

Da bei der Auswertung der histologischen Präparate einige Befunde obiger Klassifizierung nicht eindeutig zuzuordnen waren, wurde gelegentlich von einer Zwischengraduierung Gebrauch gemacht.

Gruppe I

In dieser Versuchsreihe wurden oral immunisierte Kaninchen am 4. Tage nach abgeschlossener Impfung nach oben beschriebenem Verfahren mit virulenten Sh. flexneri 2a über 24 Stunden belastet und die histologischen Befunde denen einer gleichartig infizierten Gruppe nicht immunisierter Kaninchen gegenübergestellt (s. Tab. 1 und 2).

Daß der Belastungsmodus innerhalb dieser Versuchsreihe eine Änderung erfuhr, wurde bereits erwähnt. Aus der Gegenüberstellung wird ersichtlich, daß selbst bei einer in der Zahl ansteigenden Reihe lebender, virulenter Sh. flexneri von 10^5 - 10^9 Keimen/ml kein Unterschied zwischen immunisierten und nicht immunisierten Kaninchen zu verzeichnen war, ein Immunisierungseffekt demnach also nicht zum Tragen kommt. (S. Abb. 8). Des weiteren fällt eine zunehmende Intensivierung des entzündlichen Geschehens mit der steigenden Zahl der inokulierten Mikroorganismen auf.

phys. NaCl	hitzeinaktivierte Sh. flex. 2a 10^9/ml	virulente Sh. flex. 2a 10^9/ml
normal	leicht	schwer
normal	leicht	schwer
leicht	leicht	schwer
normal	leicht-mittel	schwer

	vir. Shig. flex. 2a			
	10^5/ml	10^6/ml	10^7/ml	10^8/ml
normal	leicht-mitt.	mittel	mittel	schwer
normal	leicht	mittel	mittel	mitt.-schwer
leicht	leicht	mittel	mitt.-schwer	schwer
leicht	leicht-mitt.	mittel	mitt.-schwer	sehr schwer
normal	mittel	mittel	mittel	mittel

Tabelle 1: Gruppe I

Histologischer Befund des ligierten Dünndarms oral immunisierter Kaninchen nach Belastung am 4. Tag nach abgeschlossener Immunisierung.

phys. NaCl	hitzeinaktivierte Sh. flex. 2a 10^9/ml	virulente Sh. flex. 2a 10^9/ml
normal	leicht	schwer
normal	leicht-mittel	schwer
leicht	leicht	schwer

	vir. Shig. flex. 2a			
	10^5/ml	10^6/ml	10^7/ml	10^8/ml
normal	mittel	mittel	mitt.-schwer	schwer
leicht	leicht	mittel	schwer	sehr schwer
leicht	mittel	mittel	mittel	schwer
leicht	leicht-mitt.	mittel	mittel	schwer

Tabelle 2: Gruppe I

Histologischer Befund des ligierten Dünndarms nicht immunisierter Kaninchen nach Belastung

phys. NaCl	hitzeinaktivierte Sh. flex. 1b 10^9/ml	virulente Sh. flex. 1b 10^9/ml
normal	leicht	leicht-mittel
leicht	mittel	schwer
leicht	mittel	mittel
leicht	leicht-mittel	mittel
leicht	mittel	mittel
leicht	leicht	mittel
leicht	mittel	mittel

Tabelle 3: Gruppe II

Histologischer Befund des ligierten Dünndarms oral immunisierter Kaninchen nach Belastung am 10. Tag

phys. NaCl	hitzeinaktivierte Sh. flex. 1b 10^9/ml	virulente Sh. flex. 1b 10^9/ml
leicht	leicht	mittel
leicht	leicht	sehr schwer
leicht	leicht	sehr schwer
normal	mittel	sehr schwer
leicht	leicht	mittel
leicht	leicht	mittel
normal	leicht	mittel
normal	mittel	schwer
normal	leicht	mittel
leicht	leicht	schwer

Tabelle 4: Gruppe II

Histologischer Befund des ligierten Dünndarms nicht immunisierter Kaninchen nach Belastung

Gruppe II

10 Tage nach abgeschlossener Immunisierung wurden Kaninchen dieser Versuchsreihe mit virulenten Sh. flexneri 1b belastet. In der Gegenüberstellung zur gleichartig behandelten Kontrollgruppe (s. Tabb. 3 und 4) wird deutlich, daß bei den immunisierten Tieren in 6 von 7 Fällen nur mäßige Entzündungserscheinungen zur Beobachtung kamen, währenddessen bei den nicht immunisierten Kaninchen 6 von 10 z. T. schwere und sehr schwere entzündliche Veränderungen der Schleimhaut der mit virulenten Dysenteriebakterien infizierten Darmabschnitte, aufwiesen. Eine Wirkung der oralen Impfung ist damit offensichtlich geworden (s. Abb. 8). Ferner war auffallend, daß die mit phys. NaCl-Lösung und insbesondere die mit hitzeinaktivierten Mikroorganismen inokulierten Darmsegmente bei der Gruppe immunisierter Kaninchen eine ausgeprägtere entzündliche Reaktion aufwiesen, als die der Kontrollgruppe. Bei den mit inaktivierten Shigellen belasteten Darmabschnitten zeigten immerhin 5/7 der immunisierten zu 2/10 der nicht immunisierten Gruppe einen 'mittleren' Entzündungsgrad. Dabei war bemerkenswert, daß der Epithelverband intakt war und die vorwiegend schlanken Villi kaum ein entzündliches Oedem aufwiesen. Nur die relativ hohe Anzahl polymorphkerniger Leukozyten und die gelegentlich anzutreffenden Lymphozyten und Plasmazellen in der Lamina propria waren auffällig, so daß in der Bewertung die Zuordnung zu einem 'mittleren' entzündlichen Erscheinungsbild erfolgte. - Mit der Beurteilung der Befunde der mit inaktivierten Erregern inokulierten Darmsegmente werde ich mich noch später eingehender befassen. - Ich will damit hier, um die Wirkung der oralen Immunisierung deutlicher hervorzuheben, nur folgendes zum Ausdruck bringen: Bei den nicht immunisierten Kaninchen zeigten nur die mit virulenten Keimen beschickten Darmabschnitte auffallend schwere Entzündungserscheinungen, während bei denen mit phys. NaCl-Lösung und Impfstoff inokulierten Segmenten 'normale' und 'leichte' Befunde überwogen. Im Gegensatz dazu wiesen bei der immunisierten Gruppe die mit NaCl-Lösung und Impfstoff beschickten

Darmabschnitte bereits eine 'leichte' bis 'mittlere' und die mit virulenten Shigellen infizierten Segmente nur noch eine mäßige Steigerung der entzündlichen Reaktion auf.

Gruppe III

Die histologischen Befunde, der am 25. Tage nach oraler Immunisierung mit steigender Zahl virulenter Sh. flexneri 2a belasteten Kaninchen dieser Versuchsreihe, weisen gegenüber einer Kontrollgruppe - wie aus Tabelle 5 und 6 ersichtlich wird - nur geringgradige Unterschiede auf. Um diesen Befund zu verdeutlichen, wurde die durchschnittliche entzündliche Reaktion der mit gleicher Zahl lebender Keime belasteten Darmsegmente für jeweils immunisierte und nicht immunisierte Versuchstiere einander graphisch in Abbildung 7 gegenübergestellt. Bei dem hier allgemein nur geringen unterschiedlichen Verhalten der Darmschleimhaut gegenüber der Infektion mit virulenten Sh. flexneri bei der immunisierten und der Kontrollgruppe wurde der Befund unter der Belastung mit 10^6 Keimen/ml am deutlichsten. Diese Tatsache zusammen mit dem schnell zunehmenden Ausmaß der Entzündung bei steigender Keimzahl im Vergleich zu der in Gruppe I gemachten Beobachtungen weisen auf eine ausgeprägte Virulenz des hier verwendeten Shig. flex.-Stammes hin, womit sich die geringe Impfwirkung unter den praktizierten Versuchsbedingungen erklären ließe.

Um die unterschiedliche Reaktion der ligierten Dünndarmabschnitte auf die Belastung mit virulenten Shigellen bei den immunisierten und nicht immunisierten Versuchstieren der Gruppe I - III- d. h. die Wirkung der Immunisierung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion - anschaulicher darzustellen, verweise ich auf die Säulengraphik in Abbildung 8. Wie für Abbildung 7 wurde für das jeweilige Ausmaß der Entzündung eine Punktbewertung eingeführt:
Normal: 0, leicht: 1, leicht-mittel: 2, mittel: 3, mittel-schwer: 4, schwer: 5, sehr schwer: 6.

phys. NaCl	vir. Shig. flex. 2a 10^5/ml	10^6/ml	10^7/ml	10^8/ml
normal	leicht-mitt.	leicht-mitt.	mitt.-schwer	mittel
normal	leicht-mitt.	mittel	mittel	schwer
leicht	mittel	schwer	schwer	sehr schwer
normal	leicht-mitt.	mittel	mittel	mitt-schwer
normal	leicht	leicht	mittel	sehr schwer
leicht	schwer	schwer	sehr schwer	sehr schwer
normal	mittel	mittel	mittel	mittel

Tabelle 5: Gruppe III

Histologischer Befund des ligierten Dünndarms oral immunisierter Kaninchen nach Belastung am 25. Tag nach abgeschlossener Immunisierung.

phys. NaCl	vir. Shig. flex. 2a 10^5/ml	10^6/ml	10^7/ml	10^8/ml
leicht	schwer	sehr schwer	sehr schwer	sehr schwer
leicht	mittel	schwer	sehr schwer	sehr schwer
leicht	leicht	leicht-mitt.	leicht-mitt.	mitt.-schwer
leicht	mittel	schwer	sehr schwer	sehr schwer
leicht	mittel	schwer	schwer	sehr schwer

Tabelle 6: Gruppe III

Histologischer Befund des ligierten Dünndarms nicht immunisierter Kaninchen nach Belastung

Damit wurde ein Durchschnitt der entzündlichen Reaktion für jede Versuchsreihe - Belastung am 4., 10. und 25. Tag - sowie der zugehörigen Kontrollgruppe errechnet und einander gegenübergestellt. Wie aus den vorangegangenen Ausführungen wird deutlich, daß am 4. Tag nach abgeschlossener Immunisierung kein, am 10. Tag ein deutlicher und am 25. Tag ein abgeschwächter Immunisierungseffekt zum Tragen kommt.

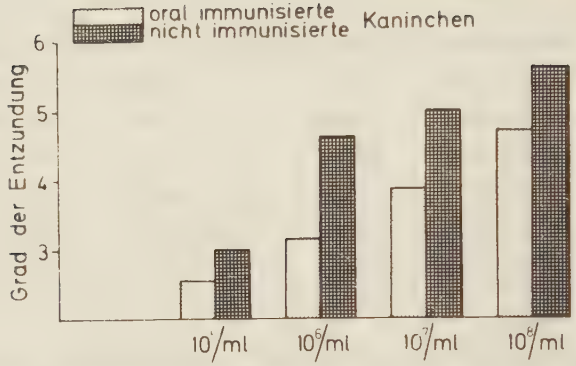


Abbildung 7: Durchschnittliche entz. Reaktion der mit gleicher Zahl lebender Keime belasteten Darmsegmente der Gruppe III

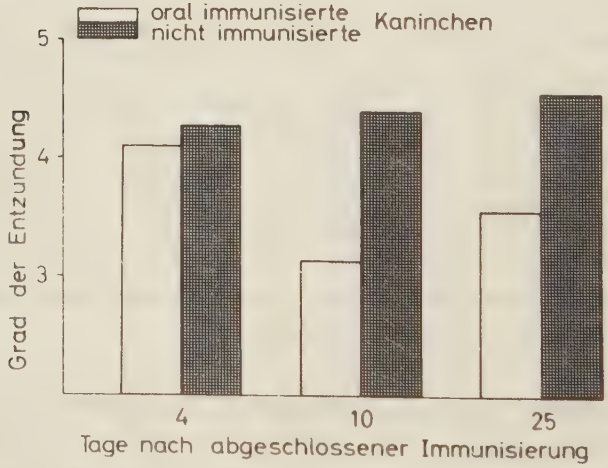


Abbildung 8: Durchschnittliche Reaktion der Darmschleimhaut oral immunisierter Kaninchen - abhängig vom Zeitpunkt der Belastung nach abgeschlossener Immunisierung - im Verhältnis zu den entsprechenden Kontrollen (Histologischer Befund)

Makroskopischer Befund

Wie aus den in der Diskussion referierten Arbeiten, denen ein gleichartiger Versuchsmodus zugrunde liegt, ersichtlich und von McNAUGHT und ROBERTS (53) insbesondere betont wird, sollten die histologischen bzw. makroskopischen Ergebnisse nicht allein, sondern vielmehr beide Befunde zur Beurteilung der Pathogenität der injizierten Mikroorganismen gewertet werden. Das ist insofern naheliegend, da die an der Darmschleimhaut zur Ausbildung kommende Entzündung - von den Anfängen einer zellulären Infiltration bis hin zu ulcero-nekrotischen Veränderungen - ab einer gewissen Stufe von einer Exsudation mehr oder minder eiweißreicher Flüssigkeit in den Darm begleitet wird.

Der makroskopische Befund beinhaltet das Vorhandensein und das Ausmaß der Darmdilatation, die bei der post mortalen Untersuchung an den mit Ligaturen versehenen Darmabschnitten infolge der Ansammlung von Exudat im Lumen zur Beobachtung kam, und die fast ausschließlich nur bei den mit virulenten Erregern inokulierten Darmsegmenten angetroffen wurde (s. Abb. 9 - 10). Das Ausmaß variierte von leichter, über eine mäßige bis zu hochgradiger Auftreibung der ligierten Darmstrecke (s. Abb. 10). In letzteren Fällen erwies sich die Darmwand infolge der übermäßigen Dehnung und der histologisch meist nachgewiesenen, umfangreichen Nekrotisierung als äußerst dünn und leicht zerreißlich. Subperitoneale petechiale bis flächenhafte Blutungen kamen in diesen Fällen des öfteren zur Beobachtung. Des weiteren waren gelegentliche fibrinöse, nur in seltenen Fällen purulente Peritonitiden, die auf die dilatierten Darmschlingen begrenzt waren, zu erwähnen. Das Exudat wies unterschiedliche Konsistenz auf und war teils von wässrig-klarer, teils von dickflüssiger, mucopurulenter, gelegentlich blutig-tingierter Beschaffenheit. Letzteres wurde zumeist bei schweren bis sehr schweren Entzündungsgraden angetroffen.

Abb. 9

Makroskopischer Befund ligierter Dünndarmsegmente nach Belastung mit 1, 5 ml x 10^9 virulenten und hitzeinaktivierter Shigellen/ml sowie phys. NaCl-Lösung über 24 Stunden. Pos. Darmreaktion an dem mit vir. Shig. flex, 2a infizierten Darmsegment.

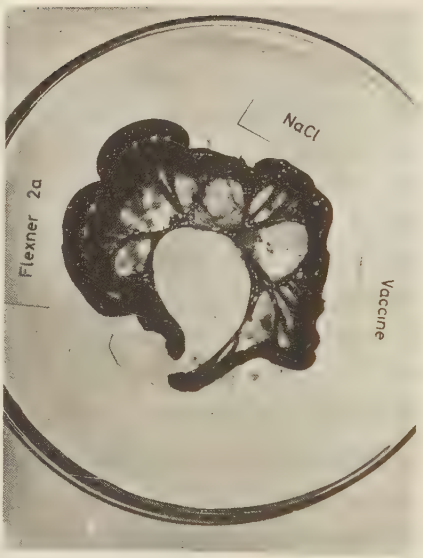
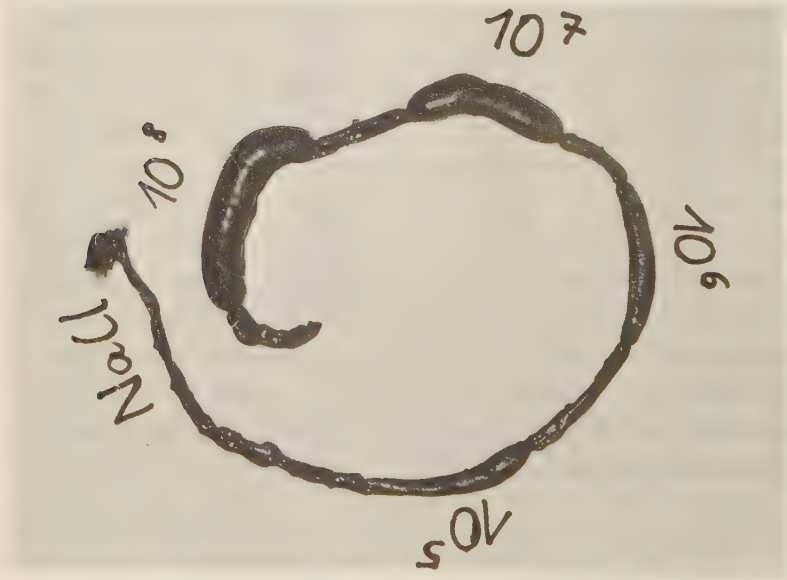


Abb. 10

Makroskopisch pos. Darmreaktion an den mit 10^8, 10^7, 10^6 und 10^5 vir. Sh. flex. 2a/ml infizierten Darmsegmenten gegenüber der mit phys. NaCl-Lösung inokulierten Darmschlinge.



	oral immunisierte Kaninchen					nicht immunisierte Kaninchen				
I	phys. NaCl	inaktiv. Sh. flex. 2a		virulente		phys. NaCl	inaktiv. Sh. flex. 2a		virulente	
	-	-		++						
	-	-		+++		-	-		+++	
	-	+		++		-	-		+++	
	-	-		+++		-	-		+++	
		vir. 10^5/ml	Shig. flex 10^6/ml	2a 10^7/ml	10^8/ml		vir. 10^5/ml	Shig. flex 10^6/ml	2a 10^7/ml	10^8/ml
	-	-	-	++	+++	-	+	++	+++	+++
	-	-	+	++	++	-	-	++	+++	+++
	-	++	++	+++	+++	-	++	++	+++	+++
	-	-	-	++	+++	-	-	-	-	+++
	-	-	-	-	+					
II	phys. NaCl	inaktiv. Sh. flex. 1b		virulente		phys. NaCl	inaktiv. Sh. flex. 1b		virulente	
	-	-		-		-	-		++	
	-	-		+++		-	+		+++	
	-	-		-		-	-		+++	
	-	-		++		-	+		+	
	-	+		+++		-	-		-	
	-	-		-		-	-		+++	
	-	-		-		-	-		-	
	-					-	+		+++	
	-					-	-		-	
	-					-	-		+++	
III	phys. NaCl	vir. 10^5/ml	Snig. 10^6/ml	flex. 10^7/ml	2a 10^8/ml	phys. NaCl	vir. 10^5/ml	Shig. 10^6/ml	flex. 10^7/ml	2a 10^8/ml
	-	-	+	++	+++	-	++	+++	+++	+++
	-	-	-	-	+++	-	++	+++	+++	+++
	-	-	+	+++	+++	-	-	-	-	+++
	-	-	-	-	-	-	++	+	+++	+++
	-	-	-	++	+++	-	++	+++	+++	+++
	-	+	++	+++	+++					
	-	-	-	++	++					

Tabelle 7: Makroskopischer Befund ligierter Darmschlingen oral immunisierter Kaninchen abhängig vom Zeitpunkt der Belastung mit vir. Shig. flexneri im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen.

Der makroskopische Befund ligierter Darmsegmente oral immunisierter Kaninchen ist in Tabelle 7 dem Befund der nicht immunisierten Versuchstiere gegenübergestellt. Hinsichtlich der Aussage über die Wirkung der oralen Impfung, abhängig vom Zeitpunkt der Belastung, korrespondieren die Ergebnisse weitgehend mit denen des histologischen Befundes.

Bei der Gruppe I - Belastung am 4. Tag nach abgeschlossener Immunisierung - wiesen die mit virulenten Sh. flexneri infizierten Darmschlingen praktisch kein unterschiedliches Verhalten gegenüber den Kontrollen auf. Ab 1,5 ml x 10^7 virulenter Keime/ml und Darmsegment aufwärts sind die erzielten Ergebnisse völlig identisch. Bei der Infektion mit 1,5 ml x 10^8 und 1,5 ml x 10^9 Erregern/ml war konstant eine Dilatation zu verzeichnen. Die geringen Unterschiede zwischen immunisierten und Kontrolltieren sind bei den mit 1,5 ml x 10^5 und 1,5 ml x 10^6 Keimen/ml infizierten Segmenten nicht zu verwerten.

In Gruppe II - Infektion am 10. Tag nach abgeschlossener Immunisierung - wurde dagegen ein Unterschied zu den Kontrollen offensichtlich. Bei den oral geimpften Kaninchen wiesen nur 3/7 gegenüber 7/10 der nicht Immunisierten eine deutliche Dilatation der mit virulenten Shigellen inokulierten Darmschlingen auf.

In Gruppe III - Belastung am 25. Tag post immunisationem - wurde eine Differenz hinsichtlich des makroskopischen Befundes nur in den mit 1,5 ml x 10^5 und 1,5 ml x 10^6 virulenten Keimen/ml infizierten Darmsegmenten deutlich. Eine Darmdilatation war nur bei 1/7 bzw. 3/7 der Immunisierten gegenüber 4/5 bei den Kontrolltieren vorhanden. Die Befunde an den mit 1,5 x 10^7 und 1,5 ml x 10^8 Keimen/ml belasteten Darmschlingen sind für die immunisierte und die Kontrollgruppe praktisch gleich.

Beziehung des histologischen zum makroskopischen Befund

Aus Vorangegangenem ist deutlich geworden, daß fast ausschließlich die

mit virulenten Shigellen infizierten Darmsegmente histologisch ausgeprägte Entzündungserscheinungen aufwiesen, die ihrerseits meist von einer zum Teil beträchtlichen Exudation ins Darmlumen begleitet wurde. Um diesen Zusammenhang zwischen histologischem Befund und der Dilatation der legierten Darmabschnitte zu verdeutlichen, sind in Tabelle 8 die unterschiedlichen Entzündungsgrade aller - mit phys. NaCl-Lösung sowie mit inaktivierten und virulenten Mikroorganismen inokulierten Darmsegmente dem jeweiligen makroskopischen Befund gegenübergestellt worden. Daraus geht hervor, daß in Fällen eines 'normalen' histologischen Bildes nie und bei 'leichten' Entzündungserscheinungen nur bei 3/46 eine Dilatation der ligierten Darmschlingen anzutreffen war. Dagegen fand in 'schweren' und 'sehr schweren' Entzündungsstadien konstant eine Exudation eiweißreicher Flüssigkeit in das Darmlumen statt. Als sehr wechselnd hinsichtlich des makroskopischen Erscheinungsbildes erwies sich das 'mittlere' Entzündungsstadium, bei dem an 22 Segmenten keine, dagegen in 26 Fällen eine deutliche Darmdilatation beobachtet wurde. Hier handelt es sich demnach um eine Übergangsphase, der ein gleiches histo-pathologisches Bild zugrunde liegt, bei der jedoch teils noch keine, teils bereits in wechselndem Ausmaß eine entzündlich bedingte Exudation stattfindet, die dann in den fortgeschritteneren Entzündungsstadien obligat ist.

Dabei sei noch auf die Relation des 'mittleren' Entzündungsgrades zur beobachteten Darmdilatation bei den immunisierten und nicht immunisierten Versuchstieren hingewiesen. Von 26 histologisch als 'mittel' befundeten Darmschlingen immunisierter Kaninchen, die mit virulenten Shigellen belastet wurden, zeigten 15 keine makroskopisch positive Darmreaktion; dagegen trat bei den Kontrollen in 11/16 Fällen eine deutliche Darmdilatation auf. Diese Beobachtung läßt sich dahingehend auswerten, daß bei den oral immunisierten Versuchstieren - gegenüber den Kontrollen - im 'mittleren' Entzündungsstadium eine weit geringere Neigung zur Exudation bestand. Eine Wirkung der oralen Impfung war hier also nachweisbar, die jedoch in den fortgeschritteneren Entzündungsstadien nicht mehr zum Tragen kam.

Histolog. Bewertung	Zahl der Segmente	Darmdilatation	
		vorhanden	nicht vorhanden
normal	19	0	19
leicht	47	3	44
leicht - mittel	13	1	12
mittel	48	22	26
mittel - schwer	7	1	6
schwer	26	26	0
sehr schwer	17	17	0

Tabelle 8: Beziehung des histologischen Befundes zur beobachteten Dilatation der ligierten Darmabschnitte

Reaktion ligierter Dünndarmschlingen nach der Injektion von phys. NaCl-Lösung und hitzeinaktivierten Mikroorganismen

Es wäre zu erwarten gewesen, daß die mit phys. Kochsalzlösung inokulierten Darmabschnitte zu einem wesentlich höheren Prozentsatz histologisch ein 'normales' Bild bieten würden. Dagegen wiesen von den insgesamt 45 Darmsegmenten nur 19 diesen Befund auf, die restlichen 26 zeigten Entzündungserscheinungen 'leichten' Grades. Zur Erklärung dieses Umstandes muß die operative Manipulation überhaupt wie auch der künstlich gesetzte Ileus als unspezifischer Reiz in Betracht gezogen werden, zumal die Darmanteile, die zur Erstellung des 'Normal' -Befundes entnommen wurden, aus nicht voroperierten Kaninchen stammten.

Aus der histologischen Untersuchung von insgesamt 24 mit hitzeinaktivierten Mikroorganismen belasteten Dünndarmschlingen geht hervor, daß im Vergleich zu den mit phys. NaCl-Lösung inokulierten Schlingen nie ein 'Normal' -Befund, sondern vielmehr 'leichte' bis 'mittlere' Entzündungserscheinungen angetroffen wurden. Der Befund von 15 'leichten', 3 'leicht-mittleren' und 6 'mittleren' Entzündungsgraden läßt Rückschlüsse auf eine vorhandene, wenn auch geringe Toxizität der hitze-

inaktivierten Sh. flexneri zu. In 5 Fällen wurde selbst eine angedeutete Ansammlung von Exudat im Darmlumen beobachtet. Auffallend war ferner das bereits im histologischen Befund der Gruppe II erwähnte Phänomen, daß an 5/7 mit Impfstoff belasteten Darmsegmenten immunisierter Tiere ein 'mittleres' Entzündungsstadium zur Ausbildung kam. Dabei war kaum entzündlich bedingtes Ödem anzutreffen, vielmehr war die relativ hohe Anzahl polymorphkerniger Leukozyten und vereinzelt beobachtete Plasmazellen und Lymphozyten bemerkenswert.

DISKUSSION

Die durch verschiedene Erreger hervorgerufene Enteritis des Menschen unterscheidet sich durch ihre Epidemiologie und den klinischen Verlauf, der letztlich abhängig ist von der Virulenz des jeweiligen Erregers und der Auswirkung der freigesetzten Toxine auf den Organismus. Der Enteritis gemeinsam ist eine nicht genormte Inkubationszeit; sie stellt keine zyklische Infektionskrankheit dar, und hinterläßt nicht zuletzt nur eine lokal wirksame Immunität, die von begrenzter, relativ kurzer Dauer ist. Dieser Erkrankung liegt ein gleiches pathologisch-anatomisches Geschehen an der Darmschleimhaut zugrunde - unabhängig von dem auslösenden Agens - und beruht auf einer primär wohl toxisch bedingten Gefäßschädigung in der terminalen Strombahn, woraus eine erhöhte Kapillarpermeabilität resultiert. Im Zuge dieser Exudation, die in der Tunica propria, vornehmlich im Zottenstroma ihren Ausgang nimmt und in die äußeren Schichten der Darmwand fortschreiten kann, kommt es zu einer unspezifischen zellulären Infiltration vorwiegend granulozytären Charakters. Bei vorerst noch intaktem Schleimhautepithel setzt eine Transsudation eiweißarmer Flüssigkeit in das Darmlumen ein und ist neben der erhöhten Darmmotilität für die Diarrhoe, in ausgeprägten Fällen für das Absetzen reiswasser-ähnlicher Stühle, verantwortlich. Dieser unspezifischen Entzündung folgt eine fokale, fortschreitende Nekrose des Epithels, die als Folge einer durch die vaskulären Stase bedingten Ischämie und möglichen toxischen Schädigung anzusehen ist. Erst dadurch ist die Voraussetzung für die Ausbildung einer erosiven pseudomembranösen Entzündung bis hin zu ulceronekrotischen Veränderungen an der Darmschleimhaut geschaffen (18, 36, 49, 82). Daß ein Stillstand und eine Ausheilung in jedem Entzündungsstadium - und bei noch intaktem Epithel eine restitutio ad integrum - möglich ist, sei hier noch bemerkt.

Um über die Pathogenese der humanen Enteritis weitere Aufschlüsse zu erhalten - darunter das gemeinsame wie das spezifische Verhalten

der jeweiligen Erreger, den Immunmechanismus und weiteres mehr - ist es unumgänglich die Enteritis tierexperimentell nachzuahmen. Einige Versuchsmodelle und ihre Ergebnisse, hier speziell für die Ruhrinfektion, wurden in der Einleitung bereits erwähnt. Ich möchte mich hier nun eingehender den relativ wenigen Veröffentlichungen zuwenden, denen ein gleicher Belastungsmodus, wie er in dieser Arbeit praktiziert worden ist, zugrunde liegt, um auf dessen Problematik und die gezeitigten Ergebnisse hinzuweisen.

1953 haben DE und CHATTERJE (11) anhand der von ihnen entwickelten Technik darauf hingewiesen, daß in ligierte Dünndarmschlingen des Kaninchens injizierte virulente V. cholerae - im Gegensatz zu avirulenten Stämmen - nach 24 Stunden eine deutliche Anschwellung des Darmes infolge Ansammlung eines proteinreichen Exudats verursachten und histologisch eine Desquamation des deckenden Epithels mit teilweise hämorrhagischen Nekrosen ganzer Villi sowie eine Oedemisierung der Submucosa stattfand. DE betrachtete eine erhöhte Kapillarpermeabilität als Ursache dieses Geschehens. Eine polymorphzellige leukozytäre Infiltration wurde nicht beobachtet. In der 1956 veröffentlichten Arbeit (12) untersuchte DE mit der gleichen Technik das Verhalten von E. coli, die aus dem Stuhl gesunder, sowie von akuten und chronischen Enteritisfällen isoliert worden waren. Dabei wurde offen sichtlich, daß fast alle der von akuten Enteritiden isolierten Stämme einen deutlichen - den Versuchen mit V. cholerae gleichenden - pathogenen Effekt in den legierten Darmsegmenten hervorriefen, jedoch nur die Hälfte der Stämme von chronischen Enteritiden und nur 3 von 20 Stämmen, die aus dem Stuhl gesunder Personen angezüchtet worden waren. Diese Methode schien mithin reproduzierbare Ergebnisse für humanpathogene Erreger im Tierexperiment zu liefern. Der Dickdarm erwies sich für diese Belastungsversuche allerdings als ungeeignet. - DE und GHOSE (13, 14) konnten nachweisen, daß selbst ein steriles Filtrat einer in 10 %igen Peptonlösung gezüchteten V. cholera-Kultur eine deutlich positive Reaktion, d. h. eine Darmdilatation und eine histologisch erfaßbare Entzündung, hervorrief.

In weiteren Versuchen zur Frage der Pathogenese der Cholera und ihr ähnelnder Enteritiden kam JENKING und ROWLEY (42) anhand der von DE beschriebenen Technik mit Stämmen von V. cholera, E. coli und Staph. aureus zu der Annahme, daß als mögliche Faktoren ihrer Enteropathogenität Milchsäure, Mucinase und ein Lipopolysacharid-Endotoxin in Betracht zu ziehen sind. Daran knüpft sich allerdings die Bedingung, daß nur lebende Kulturen, die diese Faktoren zu produzieren vermögen, eine positive Reaktion hervorrufen können. JENKING und ROWLEY gelang es in weiteren Versuchen (43) nach aktiver intravenöser Immunisierung mit hitzeinaktivierten V. cholerae und passiver intravenöser Impfung beim Kaninchen, einen deutlichen Schutz gegenüber einer künstlichen Infektion mit homologen Keimen in der ligierten Dünndarmschlinge zu erzielen.

FORMAL und Mitarbeiter (23) verfolgten 1961 in Versuchen mit V. cholerae, die in ligierte Darmabschnitte des Kaninchens injiziert wurden, anhand fraktionierter Untersuchungen vom Zeitpunkt der Infektion, die Manifestation einer Entzündung von ihren ersten Anzeichen bis hin zur vollen Ausbildung derselben. Ihre Beobachtungen stehen in gewissem Widerspruch zu denen von DE (11, 12) sowie von JENKING und ROWLEY (42, 43), da nämlich in den frühen Entzündungsstadien eine polymorphzellige leukozytäre Infiltration in die Tunica propria stattfindet, die in späten Stadien, wenn es zur Ausbildung von Nekrosen bis in tiefere Schichten der Schleimhaut gekommen ist, nicht mehr nachzuweisen ist. Ferner kam es bereits bei noch intaktem Epithel zu Verlust einer eiweißarmen Flüssigkeit in den Darm und nicht erst, wie von DE angenommen wurde, bei geschädigtem Epithel. FORMAL weist insbesondere auf die Ähnlichkeit der früheren Entzündungserscheinungen mit denen bei der Cholerainfektion des Menschen hin.

In einer Reihe von Arbeiten haben TAYLOR und Mitarbeiter die Methode der ligierten Dünndarmschlinge des Kaninchens zu Versuchen mit enteropathogenen Stämmen von E. coli verwandt. TAYLOR hat sich in seiner ersten Veröffentlichung (34) vorerst der Aufgabe gewidmet,

möglichst zuverlässige Ergebnisse zu erzielen. Um die zum Teil erhebliche Variationsbreite der Befunde von Tier zu Tier zu reduzieren, empfahl er, männliche Kaninchen einer Rasse zu verwenden und bei gleicher Diät zu halten. In der eingehenden Beurteilung der histologischen Befunde wies er auf einen eindeutig purulenten Charakter der inflamatorischen Veränderungen hin. Eine Ansammlung von Exudat wurde erst bei fortgeschrittener Entzündung beobachtet. Entsprechend den Versuchen von DE (12) und McNAUGHT und ROBERTS (53) wies TAYLOR (85) - aufgrund der korrespondierenden Ergebnisse - auf die Effizienz dieser Technik hinsichtlich des Nachweises der Enteropathogenität verschiedener Stämme von E. coli hin. So riefen von Enteritisfällen isolierte E. coli konstant eine positive Darmreaktion hervor, nicht jedoch E. coli die aus dem Stuhl gesunder Personen, von Tieren oder aus dem Trinkwasser angezüchtet worden waren. - Die Wirkung einer aktiven parenteralen Immunisierung überzeugte bei nachfolgender Belastung nicht; wurden jedoch enteropathogene E. coli mit homologem Antiserum ins Darmlumen injiziert, wurde ein passiver Schutz deutlich. In allen Fällen, sei es bei negativer oder positiver entzündlicher Reaktion, bei immunisierten und nicht immunisierten Tieren, konnte ein gleichartiger Anstieg der Keimzahl, d. h. eine unbeeinträchtigte Vermehrungsfähigkeit beobachtet werden.

TAYLOR veröffentlichte des weiteren Versuche mit verschiedenen Stämmen von Salmonellen und Shigellen (86). Mit dem experimentellen Nachweis der Enteropathogenität am ligierten Kaninchendarm wurde sehr unterschiedliches Verhalten offenbar. Rough-Formen sonst pathogener Stämme riefen keine positive Darmreaktion hervor, auch schien die Dauer der Isolation die Pathogenität zu beeinflussen. - TAYLOR (87) gelang es ferner, am ligierten Darmsegment mit Chloroform abgetöteten E. coli-Kulturen eine positive entzündliche Reaktion zu provozieren; jedoch verloren sie diese Fähigkeit in Abhängigkeit von der Dauer der Aufbewahrung. Er nahm daher an, daß diese Wirkung auf den Verlust der Esteraseaktivität zurückzuführen sei. Mit Toluol-ab-

getöteten Kulturen kam er zu negativen Ergebnissen.

Neben den bereits erwähnten Versuchen von TAYLOR (86) haben sich insbesondere ARM und FLOYD (2, 20) dem Verhalten von Shigellen im segmentierten Kaninchendarm zugewandt. Sie berichteten über Belastungsversuche mit verschiedenen Shigellae-Serotypen am Kaninchen und Meerschweinchen (20) und führten aufgrund der beobachteten Virulenzänderung den Nachweis, daß der Pathogenitätsverlust der Shigellen vornehmlich von der Dauer der Passage auf künstlichen Nährmedien abhängig war. Andererseits konnten avirulent gewordene Stämme ihre ursprüngliche Pathogenität durch mehrfache aufeinanderfolgende Infektion ligierter Darmsegmente zurückgewinnen. Der histologische Befund des entzündlichen Geschehens am Darm war beim Kaninchen und Meerschweinchen der gleiche und ähnelte in vieler Hinsicht der Dysenterie des Menschen. Die Merrschweinchen erwiesen sich für diese Versuche allerdings als wenig geeignet, da sie den operativen Eingriff meist nur sehr schlecht überstanden.

ARM und FLOYD haben 1964 in einer weiteren, umfangreichen Versuchsreihe (2) mit Sh. dysenteriae, flexneri, boydii und sonnei über die Manifestation und das Fortschreiten der Entzündung am Darm durch fraktionierte Untersuchungen ab der 3. bis 24. Stunde post infectionem berichtet. Der erwähnte Virulenzverlust durch längere Passage auf künstlichen Nährmedien wurde hier bestätigt. Ferner riefen sterile Kulturfiltrate keine entzündliche Reaktion hervor.

Als letztes sei den Parallelversuchen von SASAKI, GHODA und YAHAGI (80, 89) mit V. parahaemolyticus, Sh. flexneri, enteropathogenen E. coli und E. coli besondere Beachtung geschenkt. Die Autoren haben in vielfältiger Variation drei ligierte Dünndarmschlingen des Kaninchens belastet und stellten die Befunde von homolog intravenös immunisierten Kaninchen denen einer Kontrollgruppe gegenüber. In zeitlich fraktionierten Untersuchungen ab der 3. bis 24 Stunde post infectionem kamen die Autoren zu folgenden Ergebnissen:

a) Bei den Kontrolltieren vermehrten sich die verschiedenen Erreger in Bezug zur Infektionsdauer annähernd gleich und unabhängig von ihrer Pathogenität.

b) Im Gegensatz dazu konnte bei den immunisierten Tieren, in denen mit Sh. flexneri und enteropathogenen E. coli infizierten Darmschlingen nach 6 Stunden eine deutliche Verminderung der Keimzahl beobachtet werden, nicht jedoch in den Darmsegmenten, die mit E. coli und V. parahaemolyticus beschickt worden waren.

c) Der Entzündungscharakter war im histologischen Bild in allen Fällen der gleiche, er unterschied sich lediglich in der Schnelligkeit der Ausbildung.

d) Eine histologisch oder makroskopisch erfaßbare Wirkung der parenteralen Impfung kam nicht zur Beobachtung.

Obwohl die Dysenterie beim Menschen und Affen, weniger ausgeprägt bei den Nagetieren, sich als eine lokale Schleimhautentzündung im Bereich des terminalen Ileums, des Cöcums und Colons darstellt, und sich damit von Enteritiden anderer Genese durch diese begrenzte Lokalisation unterscheidet, sind die Versuche ausnahmslos am ligierten Dünndarm durchgeführt worden, da sich der Dickdarm im allgemeinen als ungeeignet erwies. Ferner ist von verschiedenen Autoren auf die Bedeutung der Dünndarmpassage für die Manifestation der bakteriellen Ruhr hingewiesen worden. Entscheidend für die Infektion ist die Vermehrung virulenter Shigellen im Dünndarm (25, 45) der andererseits durch seine Motilität, die Anwesenheit sauren Magensaftes, proteolytischer Fermente und der natürlichen Darmflora den bedeutendsten Abwehrmechanismus darstellt (21, 30, 31, 74). Auch ist für eine wirksame Immunität die Freisetzung und demnach die Anwesenheit von Koproantikörpern im Dünndarm allein bedeutsam (32).

Daß sich am ligierten Kaninchendarm mit virulenten, entero-pathogenen Bakterien eine im histologischen Bild der Enteritis des Menschen gleichenden Entzündung in allen ihren Entwicklungsstadien provozieren

läßt, ist von verschiedenen Autoren (2, 23, 53, 84, 89) betont worden. Zudem bestehen keine wesentlichen Unterschiede zu den histopathologischen Veränderungen an der Darmschleimhaut des Affen (28, 47) und am Merrschweinchen (21, 22, 25, 26, 20), die durch eine Infektion mit virulenten Shigellen hervorgerufen wurden. Während die verschieden ausgeprägten Entzündungsstadien am ligierten Kaninchendarm entweder durch die Belastung mit verschiedenen Erregern (86, 89) oder mit verschiedenen Serotypen eines Erregers (53, 84, 89) oder im Vergleich von Tier zu Tier durch zeitlich fraktionierte Untersuchungen vom Zeitpunkt der Infektion (2, 23, 89) beobachtet wurden, hat der Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt, daß sich das Ausmaß der Entzündung an einem mehrfach segmentierten Dünndarm zu der Belastung mit einer steigenden Anzahl virulenter Shigellen annähernd proportional verhält (s. Tab. 1, 2, 5, 6). Auf den Zusammenhang zwischen der jeweiligen Keimzahl und der induzierten entzündlichen Veränderung ist verschiedentlich (2, 7, 85, 80) bereits hingewiesen worden. Daß der ligierte Dünndarm des Kaninchens jedoch einen so empfindlichen Gradmesser für die Belastung mit enteropathogenen Erregern darstellt, ist in vorliegenden Versuchen erst deutlich zum Ausdruck gekommen.

In Übereinstimmung mit der Beobachtung von FORMAL (23) haben sich in sehr ausgeprägten Entzündungsstadien keine polymorphkernigen Leukozyten mehr nachweisen lassen. Ursächlich ist dafür in Betracht zu ziehen, daß entweder die Leukozyten ähnlich dem Gewebe der Nekrolyse anheimgefallen sind, oder aber es hat aufgrund einer beschleunigten Ausbildung eines Ödems mit nachfolgender Ischämie und Nekrose der Darmwand erst gar keine leukozytäre Infiltration stattgefunden.
Anhand meiner Belastungsversuche mit steigender Zahl virulenter Shigellen schließe ich mich der Auffassung von FORMAL (23) an, der aufgrund zeitlich fraktionierter Untersuchungen die entzündlich bedingte Zellinfiltration als einen obligaten histo-pathologischen Prozeß herausstellt - der fehlende Nachweis bei schweren entzündlichen Veränderungen also einer Karyorrhexis und Cytolyse zuzuschreiben ist. Daß DE in seinen Versuchen mit V. cholerae und E. coli eine leukozytäre In-

filtration nicht hat nachweisen können, findet dadurch möglicherweise eine Erklärung -, zumal die Versuchstiere erst 24 Stunden nach der Keimbelastung getötet wurden und in den dilatierten Darmschlingen proteinreiches Exudat vorgefunden wurde, das nach meinen und den Erfahrungen von TAYLOR (84) und FORMAL (23) erst in fortgeschrittenen Entzündungsstadien - also erst bei beginnender Erosion und Nekrose der Lamina propria - im Lumen angetroffen wurde.

Die makroskopisch sichtbare Ansammlung von Exudat in der ligierten Darmschlinge bietet nur einen sehr groben Anhalt zur Bewertung der entzündlichen Reaktion der Darmschleimhaut. Aus der Gegenüberstellung des histologischen zum makroskopischen Befund (Tabelle 8) ging hervor, daß eine Darmdilatation erst in fortgeschrittenen Entzündungsstadien obligat war, während sie bei mäßigem entzündlichen Bild in wechselndem Ausmaße und bei gering ausgeprägter Reaktion praktisch gar nicht angetroffen wurde. TAYLOR und YAHAGI machten in ihren Versuchen mit enteropathogenen E. coli (84, 89) ähnliche Beobachtungen; es bot sich auch hier kein Anhalt dafür, daß die Exudation ins Darmlumen und die leukozytäre Infiltration in die Lamina propria getrennte Vorgänge seien, d. h. durch verschiedene Faktoren ausgelöst würden. Daraus ist abzuleiten, daß das Vorhandensein von Exudat im Darmlumen eine histologisch nachweisbare Entzündung zur Voraussetzung hat, aber im umgekehrten Falle, bei makroskopisch negativem Befund, nicht auf ein Fehlen einer leukozytären Infiltration geschlossen werden kann.

Bei den wenigen Kaninchenversuchen, in denen der Frage über die Wirkung einer aktiven Immunisierung durch die anschließende homologe Belastung am ligierten Dünndarm nachgegangen worden war, wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse gezeitigt. JENKING und ROWLEY (43) haben nach aktiver und passiver intravenöser Immunisierung durch die nachfolgende Infektion mit virulenten V. cholerae makroskopisch einen eindeutigen Impfschutz nachweisen können. TAYLOR (85) kam nach gleichartigem Immunisierungs- und Belastungsmodus mit E. coli

zu weniger überzeugenden Ergebnissen. In einer gemeinsam mit SASAKI und GHODA durchgeführten Versuchsreihe hat YAHAGI (89) nach jeweiliger intravenöser Immunisierung mit V. parahaemolyticus, Sh. flexneri und zwei E. coli-Stämmen sowohl bei homologer, als auch bei heterologer Infektion histologisch und makroskopisch keine Wirkung der parenteralen Impfung nachweisen können. SASAKI (80) hat nach Belastung ligierter Darmsegmente mit Sh. flexneri und enteropathogenen E. coli am homolog immunisierten Kaninchen lediglich eine Reduktion der injizierten Keimzahl 6 Stunden post infectionem beobachtet.

Versuche,die Wirkung oraler Immunisierung anhand dieses Versuchsmodells zu demonstrieren, finden lediglich bei FRETER (33) im Rahmen vergleichender Untersuchungen über den Immunmechanismus der Cholera in verschiedenen tierexperimentellen Modellen Erwähnung. Es gelang FRETER nach Verfütterung lebender sowie hitzeinaktivierter Keimsuspensionen an 15 aufeinanderfolgenden Tagen am 4. anschließenden Tag gegenüber Kontrolltieren einen deutlichen Impfschutz bei einer Belastung mit 10^6 virulenten Keimen pro ml und Darmschlinge nach einem Zeitraum von 16 - 18 Stunden zu erzielen. Es fanden allerdings auch hier nur makroskopische Kriterien Anwendung.

Im Ergebnisteil meiner Arbeit habe ich auf eine unterschiedliche, makroskopisch und histologisch erfaßbare Reaktion an immunisierten gegenüber nicht immunisierten Kaninchen hinweisen können. Die - nach den von RAETTIG (69) zur Frage der Dosierung und des Impfrhythmus erarbeiteten Grundlagen - spezifisch oral immunisierten Kaninchen wiesen am 4. Tag nach abgeschlossener Immunisierung noch keinen, am 10. Tag einen deutlichen und am 25. Tag noch einen mäßigen Impfschutz auf. Durch die jeweilige Belastung ligierter Darmschlingen mit 1,5 ml x 10^9 virulenter Sh. flex. ml am 10. Tag und mit 1,5 ml x 10^5 und 1,5 ml x 10^6 Sh. flex. ml am 25. Tag nach abgeschlossener Immunisierung kam ich nach makroskopischen Kriterien zu annähernd gleichen Ergebnissen wie FRETER (33). Daß sich am 4. Tag post immunisationem überhaupt kein und am 25. Tag bei einer Infektionsdosis

von 1,5 ml x 10^7 und 1,5 ml x 10^8 Sh. flex./ml nur noch ein sehr gering ausgeprägter Impfschutz gegenüber den Kontrollen hat nachweisen lassen, ist nach meinem Dafürhalten mehr in der Versuchsanordnung und in der Methode der ligierten Darmschlinge selbst zu suchen. Dazu bedarf es einiger Vorbemerkungen:

Daß die nach lokaler Anwendung infektionstüchtiger Antigene erworbenen Muco- bzw. Kopro-Antikörper eine viel bessere Widerstandsfähigkeit gegenüber einer homologen Infektion gewähren, als durch eine parenterale Immunisierung erzielbar ist, ist von zahlreichen Autoren, darunter BURROWS (4-6), FRETER (34) und HEREMANS (39) hervorgehoben worden.

Inwiefern nach beschriebenem Impfmodus am 4. Tag nach der letzten oralen Antigengabe bereits ein, wenn auch nur geringer lokaler Impfschutz vorlag, muß dahingestellt bleiben, zumal in der Literatur keine übertragbaren Beobachtungen und keine Untersuchungen über das erste Auftreten und den Titerverlauf der Kopro-Antikörper beschrieben worden sind.

Von den Immunglobulinen der externen Sekretionen stellt das IgA die Hauptkomponente dar und chronologisch geht ihr Erscheinen in den Sekretionen ihrem Auftreten im Serum voran (39).

Die Titerhöhen der durch orale Immunisierung induzierten Kopro-Antikörper stehen jedoch in keinerlei Zusammenhang mit dem zeitlichen Verlauf der Serumantikörper (31, 33, 34, 39), so daß sich die Verhältnisse nach parenteraler Immunisierung, die in fast allen Studien auf diesem Gebiet praktiziert wurde, nicht übertragen lassen.

Die Annahme HEREMANS (39), daß die Schutzfunktion des exokrinen IgA nicht auf einer bakteriziden Eigenschaft begründet ist, sondern auf seinem Vermögen, der Resorption der mit schwer katabolisierbaren Antikörpern verbundenen Antigenen entgegenzuwirken, erfährt durch die Beobachtungen von FRETER (31, 33) und TAYLOR (85) in Versuchen an der ligierten Darmschlinge dadurch weitere Unterstützung, da

an aktiv und passiv immunisierten Versuchstieren keine Reduktion der injizierten Keimzahl beobachtet wurde; vielmehr fand eine kontinuierliche Vermehrung der injizierten Mikroorganismen statt, die des weiteren von der jeweiligen Pathogenität der Erreger unabhängig war (25, 33, 47, 80, 85). Da der Dünndarm entscheidender Abwehrmechanismen durch die Ligatur beraubt wird - darunter ist an erster Stelle seine Motilität und des weiteren die Anwesenheit sauren Magensaftes und proteolytischer Fermente zu zählen - ist unter diesen Bedingungen die Möglichkeit einer stetigen ungehinderten Vermehrung der injizierten Mikroorganismen gegeben. Bei einer Infektion mit enteropathogenen virulenten Erregern - das haben diese und vorangegangene Arbeiten gezeigt (2, 23, 89) - wird eine Enteritis innerhalb weniger Stunden provoziert, deren Ausmaß direkt proportional zur Infektiondosis und zur Dauer der Belastung steht. Der Darmligatur-Test ist durch die wesentlich zeitliche Verkürzung, in der sich die pathologisch-anatomischen Veränderungen hier abspielen, daher auch sehr treffend in seiner Wirkung mit einem Vergrößerungsglas verglichen worden (89).

Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten haben Versuche zur Frage des Impfschutzes gegen die Infektion mit enteropathogenen Bakterien an der ligierten Darmschlinge nur unter bestimmten Voraussetzungen eine verbindliche Aussage.

Es ist anzunehmen, da gegenüber einer natürlichen oralen Keimbelastung in diesem geschlossenen System eine unverhältnismäßig hohe Zahl an virulenten Erregern mit der Darmschleimhaut kontaktieren, daß die Anwesenheit der Kopro-Antikörper in dem relativ kurzen Darmabschnitt nur einen begrenzten Impfschutz gewährt, der insbesondere durch die ungehinderte Vermehrung der Erreger und der dementsprechend vermehrt freigesetzten Toxine unterlaufen werden kann. Damit will ich zum Ausdruck bringen, daß nur unter der Voraussetzung einer optimalen Abstimmung zwischen Infektionsdosis und der Dauer der Belastung reproduzierbare Ergebnisse zu erwarten sind. Aufgrund der unterschiedlichen Virulenz enteropathogener Erreger überhaupt wie auch der

Serotypen eines Erregers untereinander und aufgrund der Möglichkeit spontaner Virulenzänderung - wie dies nach meinen und den Erfahrungen anderer Autoren (2, 86) insbesondere auf Shigellen zutraf - würde ich den Belastungsmodus mit einer steigenden Zahl virulenter Mikroorganismen - wie er hier z. T. praktiziert wurde - über einen kürzeren Zeitraum - zwischen 9 - 18 Stunden post infectionem - empfehlen. Daß der von mir gewählte Zeitraum von 24 Stunden als zu lang betrachtet werden muß, ist aus Tab. 5 und 6 ersichtlich geworden. Zeitlich fraktionierte Untersuchungen von FORMAL (23), ARM (2) und YAHAGI (89) haben gezeigt, daß sich eine deutliche makroskopische und histologische Reaktion bereits nach 9 Stunden manifestieren kann.

Versuche, die Wirkung abgetöteter Keimsuspensionen oder deren Filtrate in der ligierten Dünndarmschlinge des Kaninchens zu verfolgen, haben zu sehr unterschiedlichen Beobachtungen geführt. Während DE (14) sowie BURROWS (7) mit sterilen V. cholera-Kulturfiltraten und TAYLOR (87) mit chloroformabgetöteten E. coli-Kulturen eine makroskopisch erfaßbare Entzündung haben nachweisen können, kamen ARM (2) mit inaktivierten Shigellen und zellfreien Kulturextrakten und und TAYLOR (87) mit Toluol abgetöteten E. coli zu negativen Ergebnissen. - Von den insgesamt 24 Darmsegmenten, die in den hier vorliegenden Versuchen mit hitzeinaktivierten Shigellen belastet worden waren, sind überwiegend nur 'leichte' und 'mittlere', also nur histologisch nachweisbare Entzündungserscheinungen beobachtet worden. Eine gering ausgeprägte Ansammlung von Exudat im Darmlumen war nur in 5 Fällen vorhanden. Auffallend hingegen war die vornehmlich 'mittlere' entzündliche Reaktion an den immunisierten Kaninchen der Gruppe II (s. Tab. 7). Inwiefern es sich hier um eine unspezifische zelluläre Immunreaktion nach neuerlichem Antigenreiz handelt, läßt sich anhand dieser Versuchsreihe lediglich vermuten. Gezieltere Untersuchungen wären zur Klärung dieser Frage noch vonnöten.

Abschließend läßt sich sagen, daß sich die Technik der ligierten Darmschlinge am lebenden Kaninchen für Belastungsversuche mit humanpathogenen, enteritis-erregenden Bakterien bewährt, zumal sich in

diesem Modell eine der Enteritis des Menschen gleichende pathologisch-anatomische Reaktion provozieren läßt. Trotz der Einschränkungen der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf menschliche Verhältnisse, mit der wohl jedes Tierexperiment behaftet ist, erlaubt dieser Belastungsmodus sinnvolle Grundversuche zur Erforschung der Immunmechanismen, die für die Abwehr lokaler, intestinaler Infektionskrankheiten entscheidend sind. Die Wirkung eines oral erzielten Impfschutzes gegen die Enteritisinfektion wird hier direkt offensichtlich, zudem stellt die Injektion virulenter Erreger in ligierte Darmschlingen eine physiologischere Belastungsform dar, als die vielfach widernatürlich angewandte, parenterale Infektion.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung einer spezifischen oralen Impfung mit hitzeinaktivierten Shigellen wurde anhand der Belastung ligierter Dünndarmschlingen lebender Kaninchen mit virulenten Sh. flexneri über 24 Stunden bei unterschiedlicher Keimkonzentration - in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion nach abgeschlossener Immunisierung - untersucht. Als Kriterien des Impferfolges wurden sowohl die histo-pathologischen Veränderungen an der Darmschleimhaut wie auch das Vorhandensein makroskopisch sichtbarer Ansammlung von Exudat im Lumen bei immunisierten gegenüber nicht immunisierten Versuchstieren gewertet.

1. Am 4. Tage nach abgeschlossener Immunisierung ließ sich kein Impfschutz nachweisen, dagegen wurde am 10. Tag post immunisationem ein deutlicher und am 25. Tag ein abgeschwächter Impferfolg offensichtlich.

2. Histologischer und makroskopischer Befund sagten annähernd das gleiche aus. Die histologische Beurteilung gestattet jedoch, einen wesentlich empfindlicheren Nachweis bei unterschiedlich ausgeprägten entzündlichen Veränderungen führen zu können. So war das Ausmaß der Entzündung an einem mehrfach ligierten Dünndarm eines Kaninchens annähernd proportional zu der jeweiligen Konzentration der injizierten virulenten Mikroorganismen.
   Das am Dünndarm des Kaninchens provozierte entzündliche Geschehen ähnelte in vieler Hinsicht dem Bild der Enteritis des Menschen.

3. Hitzeinaktivierte Keimsuspensionen riefen gegenüber virulenten Shigellen in der Regel nur eine histologisch erfaßbare, mäßige Reaktion an der Darmschleimhaut hervor.

Die anhand dieses Belastungsmodus gezeitigten Ergebnisse wurden mit denen anderer Autoren verglichen und in diesem Rahmen auch mögliche beeinflussende Faktoren herausgearbeitet und zur Diskussion gestellt.

LITERATUR

1. Alivisatos, G. P. — Die perorale Immunisierung gegen die Ruhr. Immunität, Allergie u. Infekt. Krh. 2, 37 (1929/30)

2. Arm, H. G. Floyd, T. M. Faber, J. E. Hayes, J. R. — Use of ligated segments of rabbit small intestine in experimental shigellosis. J. Bact. 89, 803-809 (1965)

3. Besredka, A. — Die lokale Immunisierung Verlag J. A. Barth, Leipzig 1926

4. Burrows, W. E. Mather, A. N. Elliott, M. E. Havens, I. — Studies on immunity to asiatic cholera III. The mouse protection test. J. Infect. Dis. 81, 157 (1947)

5. Burrows, W. E. Elliott, M. E. Havens, I. — Studies on immunity to asiatic cholera IV. The excretion of coproantibody in experimental enteric in the guinea pig. J. Infect. Dis. 81, 261 (1947)

6. Burrows, W. E. Havens, I. — Studies on immunity to asiatic cholera V. The absorbtion of immune globulin from the bowel and its excretion in the urine and feces of experimental animals and human volunteers. J. Infect. Dis. 82, 231 (1948)

7. Burrows, W. E. Musteikis, G. M. — Cholera infection and toxin in the Rabbit ileal loop. J. Infect. Dis. 116. 183-190 (1966)

8. Chvostek, F. — Zur Frage der Immunisierung per os. Wien. klin. Wschr. 1908, 453-457. Zbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 42, 420(1909)

9. Cooper, M. L. Keller, H. M. — Immunization of mice with dysentery antigen administeres by gavage and by voluntary drinking. Proc. Soc. exper. Biol. a. med. 64, 422-425 (1947)

10. - " - — Studies on dysentery vaccination V. Immunization of mice with vaccine or Shigella sonnei administered by gavage. J. Immunol. 60, 177-180 (1948)

11. De, S. N. Chatterje, D. N. — An experimental study of the mechanism of action of Vibrio cholerae on the intestinal mucous membrane. J. Path. Bact. 66, 559-562 (1953)

12. De, S.N.
Bhattacharya, K.
Sarkar, J.K.
A study of the pathogenicity of strains of bacterium coli from acute and chronic enteritis.
J. Path. Bact. 71, 201-209 (1956)

13. De, S.N.
Enterotoxicity of bacteria-free culture filtrate of Vibrio cholerae.
Nature Lond. 183, 1533 (1959)

14. De, S.N.
Ghose, M.L.
Sen, A.
Activities of bacteria-free preparations from Vibrio cholerae.
J. Path. Bact. 79, 373 (1960)

15. Dopter, Ch.
Vaccination préventive contre la dysenterie bacillaire (ses bases expérimentales).
Ann. l'Inst. Pasteur 23, 677 (1909)

16. Ehrlich, P.
Experimentelle Untersuchungen über Immunität. Dtsch. Med. Wschr. 17, 976 (1891)

17. Falkow, S.
Schneider, H.
Baron, L.S.
Formal, S.B.
Virulence of Escherichia-Shigella genetic hybrids for the guinea pig.
J. Bact. 86, 1251-1258 (1963)

18. Fischer, W.
Ruhr und asiatische Cholera. Handbuch der spez. Path. u. Histol. 1929, Vol. IV/3 Berlin (Springer) S.422-426

20. Floyd, T.M.
Arm, H.G.
Use of the isolated segment of rabbit or guinea pig small intestine as an in vivo model for experimental shigellosis. Bact. Proc. 1962, 99

21. Formal, S.B.
Dammin, G.J.
LaBrec, E.H.
Schneider, H.
Experimental shigella infections: Characteristics of a fatal infection produced in guinea pigs.
J. Bact. 75, 604-610 (1958)

22. - " -
Experimental shigella infections: II. Characteristics of a fatal enteric infection on guinea pig following s.c. inoculation of carbon tetrachloride.
J. Bact. 78, 800-804 (1959)

23 Formal, S.B.
Kundel, D.
Schneider, H.
Kunev, H.
Sprinz, H.
Studies with Vibrio cholerae in the ligated loop of the rabbit intestine.
Brit. J. exp. Path. 42. 504-510 (1961)

24. Formal, S.B.
Dammin, G.
Sprinz, H.
Kundel, H.
Schneider, H.
Horrowitz, R.E.
Forbes, M.
Experimental shigella infections: V. Studies on germ-free guinea pigs. J. Bact. 82, 284-287 (1961a)

25. Formal, S.B.
Abrams, G.D.
Schneider, H.
Sprinz, H.
Experimental shigella infections: VI. Role of the small intestine in an experimental infection in guinea pigs. J. Bact. 85, 119-125 (1963)

26. Formal, S.B.
LaBrec, E.H.
Palmer, A.
Falkow, S.
Abortive intestinal infections with an Escherichia coli - Shigella flexneri hybrid strain. J. Bact. 89, 1374-1382 (1965)

27. Formal, S.B.
LaBrec, E.H.
Palmer, A.
Falkow, S.
Kent, T.H.
Protection of monkeys against experimental shigellosis with attenuated vaccines. J. Bact. 90, 63-68 (1965)

28. Formal, S.B.
Kent, T.H.
Austin, S.
LaBrec, E.H.
Fluorescent antibody and histological study of vaccinated and control monkeys challenged with Shigella flexneri. J. Bact. 91, 2368-2376 (1966)

29. Formal, S.B.
Kent, T.H.
May, H.C.
Palmer, A.
Falkow, S.
LaBrec, E.H.
Protection of monkeys against experimental shigellosis with living attenuated oral polyvalent dysentery vaccine, J. Bact. 92, 17-22 (1966)

30. Freter, R.
Experimental enteric shigella and vibrio infections in mice and guinea pigs. J. Exp. Med. 104, 411-418(1956)

31. Freter, R.
Coproantibody and bacterial antagonism as protective factors in experimental enteric cholera. J. Exp. Med. 104, 419-426 (1956a)

32. Freter, R.
Detection of coproantibody and its formation after parenteral and oral immunization of human volunteers. J. Infect. Dis. 111; 37-48 (1962b)

33. Freter, R.
Comparison of immune mechanisms in various experimental models of cholera, Bull. W.H.O. 31, 825-834 (1964)

34. Freter, R.
De, S.P.
Mondal, A.
Shrivastava, D.L.
Sundermann, W.
Coproantibody and serum antibody in cholera patients.
J. Infect. Dis. 115, 83-87 (1965)

35. Funk, J.
Tierversuche zur oralen Impfung mit hitzeinaktivierten Fungi (Candida albicans).
Inaug. Diss. Berlin 1969

36. Cangarosa, E.J.
Breisel, W.R.
Benyajati, C.
Sprinz, H.
Piyaratn, P.
The nature of the gastro-intestinal lesions in asiatic cholera and its relation to pathogenisis: A biopsy study.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 9, 125-135 (1960)

37. Gauthier, A.
Essais de vaccination et de vaccinothérapie par la voie buccale contre la dysenterie bacillaire.
Rev. d'Hyg. 46, 323-335 (1924)
Bull. Acad. med. 91, 72 (1924)
Zbl. ges. Hyg. 9, 170 (1925)

38. Grillo, J.
Experimentelle Untersuchungen über die Schutzimpfungen gegen Shiga-Ruhr, Aussprache zum Referat der Berliner mikrobiologischen Gesellschaft, Sitzung vom 18.3.1935.
Zbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. 118, 41(1935)

39. Heremans, J.F.
Die biologische Bedeutung des exokrinen IgA-Immunglobulins.
Behringwerk-Mitteilungen 49, 28-55(1965)

40. Iguchi, J.
Ohstubo, I.
Sugino, T.
Kanno, J.
Prophylaxis of dysenterie by per os immunization.
Kitasato Arch. Exp. Med. 9, 218-223(1932)
Zbl. ges. Hyg. 28, 623 (1933)

41. Iguchi, J.
Ohstubo, I.
Eguchi, C.
Prophylaxie de la dysenterie au moyen de l'immunisation par voie buccale.
Bull. mens. Off. Internat. Hyg. publ. 25, 635-645 (1933)
Zbl. ges. Hyg. 30, 273 (1934)

42. Jenkin, C.R.
Rowley, D.
Possible factors in the pathogenesis of cholera. Brit. J. Exp. Path. 40, 474-481 (1959)

43. - " -
The importance of antibody in the prevention of experimental cholera in rabbits.
Brit. J. Exp. med. 41, 24 (1960)

44. Kinne-Saffran, E.
Kurschilgen, E.M.
Marquardsen, A.
Raettig, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 9. Mitteilung: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Infektion durch Enteritis-erregende Salmonellen.
Zbl.f.Bakt.I. Orig. 208, 37-58 (1968)

45. Koya, G.
Kosakai, N.
Multiplication and infectivity of shigella in the human intestinal tract.
Japan. J. Assoc.Infect. Dis. 29, 638-642 (1956)

46. La Brec, E.H.
Formal, S.B.
Experimental shigella infections: IV. Fluorescent antibody studies of an infection in guinea pigs.
J. Immunol. 87, 562-572 (1961)

47. La Brec, E.H.
Schneider, H.
Magnani, T.J.
Formal, S.B.
Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery.
J. Bact. 88, 1503-1518 (1964)

48. Lefèvre, H.
Die humorale Sekundär- und Hyperimmunreaktion nach oraler Gabe von Rinderserumalbumin (BSA) beim Kaninchen.
Inaug. Diss. Berlin 1969

49. Letterer, E.
Beiträge zur Pathogenese der Bacillenruhr. Virchow. Arch. Path. Anat. Physiol. 312, 673-725 (1944)

50. Lietz, B.
Raettig, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 5. Mitt.: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Dyspepsiecoli-Infektionen.
Zbl.f.Bakt.I. Orig. 204, 543 (1967)

51. Löffler, F.
Über Immunisierung per os.
Leuthold-Gedenkschrift Bd.I.S. 247 (1906)

62. Mamsch, R.
Die lokale Immunisierung mit inaktivierten und virulenten Shigellen.
Inaug. Diss. Berlin 1969

53. McNaught, W.
Roberts, G.B.S.
Enteropathogenic effects of strains of Bacterium coli isolated from cases of gastro-enteritis.
J. Path. Bact. 76, 155-158 (1958)

54. Metschnikoff, E.
E'tudes sur l' immunité (4 memoire) L' immunité des Cobayes vaccines contre le Vibrio metschnikowi.
Ann. l' Inst. pasteur 5, 465 (1891)
L'immunité dans les malaches infectienses Paris (1901)

55. Meves, — Aufnahme und Verteilung von radioaktivierten Antigen von S. typhi murium in der Maus bei oraler, rektaler und subcutaner Anwendung. Inaug. Diss. Berlin (1966)

56. Nicolle, Ch. Conseil, E. — Vaccinations préventives par voie digestive chez l'homme dans la dysenterie bacillaire et la fièvre mediterranienne. Ann. l'Inst. Pasteur 36, 579-613(1922) Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 77, 509 (1924)

57. Otten, L. Kirschner, L. — Oral vaccination against bacillary dysentery. Transact. of the 6. congr. of the Ear Eastern assoc. of trop. med. Tokio (1925) 2, 423-438 (1926) Zbl. ges. Hyg. 15, 855 (1927)

58. Powell, L. — Du méchanisme de la vaccination antidysentérique par voie buccale. Compt. rend. Soc. Biol. 98, 350(1928) Zbl. f. Bakt. I. Ref. 90, 564 (1928)

59. Raettig, H. — Erfahrungen und vergleichende Betrachtungen über die Erfolge der parenteralen und peroralen Typhusschutzimpfung. Zschr. f. Immunforschung 108, 165(1950) Typhusimmunität und Schutzimpfungen, Jena 1952

60. - " - — Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen gegen bakterielle Darminfektionen. Zbl. f. Bakt. II. Ref. 183, 1(1962)

61. - " - — Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für Virus. Zbl. Bakt. I. Orig. 191, 97 (1963)

62. - " - — Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 1. Mitt.: Grundversuche zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis-Infektion. Zbl. f. Bakt. I. Orig. 193, 398 (1964)

63. - " - — Die aktive Immunisierung, gestern, heute und morgen. Wien. med. Wschr. 113, 366 (1964)

64. - " - — Die Wirksamkeit der oralen Immunisierung gegen Typhus und Paratyphus. Die gelben Hefte der Behringwerke 8. 279 (1964)

65. Raettig, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 2. Mitt.: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion der Maus. Zbl.f.Bakt.I. Orig. 197, 368-388(1965)

66. Raettig, H.
Neue Modellversuche zur Infektabwehr des Darmes.
Vortrag auf der 30. Tagung der Dtsch. Ges.f.Hyg. u. Microbiol. München 9.4.1965
Zbl.f.Bakt. I. Orig. 198, 206 (1965)

67. - " -
Gedanken zur Schutzimpfung im Katastrophenfall. Öffent. Gesundheitsdienst 27, 131 (1965) Wien, med. Wschr. 115, 235 (1965)

68. - " -
Die Immunprophylaxe der bakteriellen Ruhr. Bundesgesundheitsblatt 15, 227-232 (1967)

69. - " -
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 3. Mitt.: Dosierung und Impfrhythmus bei der spez. Impfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis. Zbl.f.Bakt.I. Orig. 203, 478-491 (1967)

70. Raettig, H.
Buse, A.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 4. Mitt.: Serum-Antikörper der Maus nach spez. Impfung gegen Salmonella-Enteritis.
Zbl.f.Bakt. I. Orig. 204, 221 (1967)

71. Raettig, H.
Mamsch, R.
Oral vaccination against shigellosis by means of heat-killed bacteria.
Archiv. Immunol. et Therap. Exp. 16, 324 (1968)

72. Raettig, H.
Mechanism or oral immunization with inactivated microorganisms.
Proc. 11th int. Congr. permanent. Sect. microbiol. Standard int. Ass. microbiol. Soc. Milan 1968; Pogr. immunobiol. Standard vol. 4 (Karger, Basel/New York 1969)

73. Rauss, K.
Kétyi, I.
Serum-and coproantibodies in mice, immunized perorally with shigella flexneri.
Zschr.Immun.Forsch. 127, 37-50(1964)

74. Rauss, K.
Kétyi, I.
Angyal,
Experimental studies on shigellosis in mice. Path. et Microbiol. Basel 29, 95-110 (1966)

75. Rauss, K.
Kétyi, I.
Immunological studies on shigellosis by the mouse model technique. I. Antiinfective immunity of actively immunized mice. Act. microbiol. Acad. Sci. Hung. 12, 377 (1966)

76. - " -
Immunological studies on shigellosis by the mouse model technique. II. Antiinfective immunity of passively immunized mice. Act. microbiol. Acad. Sci. Hung. 12, 387 (1966)

77. - " -
Studies on the virulence of Shigella flexneri. Act. microbiol. Acad. Sci. Hung. 14, 131 (1967)

78. Rossetini, S.M.O.
Levanon, H.
Raettig, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 7. Mitt.: Nachweis von Reaginen im Serum und in Dünndarmzellen oral geimpfter Laboratoriumstiere.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 208, 16-26(1968)

79. Sahm, E.
Sekretion von T_3-Phagen als Modellvirus in den Magen der Maus nach intravenöser Injektion.
Inaug. Diss. Berlin 1968

80. Sasaki, S.
Ghoda, A.
Yahagi, H.
Early features of infection in ligated loops of the rabbit small intestine inoculated with Shigella flexneri 3a, enteropathogenic E. coli, Escherichia coli and Vibrio parahaemolyticus. I. Keio J. Med. Vol. 16, No. 3, 101(1967)

81. Shiga, K.
Über die aktive Immunisierung per os. Saikingaku-Zassi 139 (1908)
Zbl.f.Bakt.I.Abt.Ref. 42, 419 (1909)

82. Sprinz, H.
Gangarosa, E.J.
Biopsy of small bowel of Thai people. Am.J.Clin.Path. 38, 43-51 (1962)

83. Takeuchi, A.
Sprinz, H.
LaBrec, E.H.
Formal, S.B.
Electron microscopic study of the response of the mucosa to bacterial invasion. Am.5. Path. 47, 1011-1044 (1965)

84. Taylor, J.
Maltby, M.P.
Payne, J.M.
Factors influencing the response of ligated rabbit gut segments to injected E. coli. J. Path. Bact. 76, 491-499 (1958)

85. Taylor, J.
Wilkins, M.P.
Payne, J.M.
Relation of rabbit gut reaction to enteropathogenic E. coli.
Brit. J. Exp. Path. 42, 43-52 (1961)

86. Taylor, J.
Wilkins, M.P.
The effect or salmonella and shigella on ligated loops of rabbit gut.
Indian J. Med. Res. 49, 544-549 (1961)

87. Taylor, J.
Bettelheim K.A.
The action of chloroform-killed suspensions of enteropathogenic E. coli on ligated rabbit gut segments.
J. gen. Microbiol. 42, 309 (1966)

88. Tchernozoubov, N.
Sur l'immunisation activ contre la typhus et la dysenterie, en particulier au moyen de la vaccination per os suivant la méthode de Besredka.
Bull. mens. Off. internat. Hyg. publ. 27, 2158 (1935)

89. Yahagi, H.
Ghoda, A.
Sasaki, S.
Early features of infections in ligated loops of the rabbit small intestine inoculated with Shigella flexneri 3a, enteropathogenic E. coli, Escherichia coli and Vibrio parahaemolyticus. II.
Keio, J. Med. Vol. 16. No. 3, 119(1967)

90. Zabolotny
Infektions- und Immunisierungsversuche am Ziesel gegen den Choleravibrio.
Zbl. f. Bakt. I. Orig. 15, 150-157 (1894)

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Raettig für die freundliche Überlassung des Themas, für seine Anregungen und seine hilfreiche Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen - Frau G. Dean und Frau B. Ganze - der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung am Robert Koch-Institut für ihre Mitarbeit und Hilfe.

Am 9.1.1943 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Dr. Georg Gebhardt und seiner Ehefrau Irmhild in Swakopmund, Süd-West-Afrika, geboren. Ich bin Staatsbürger der Republik von Südafrika.

Seit 1949 besuchte ich die "Deutsche Höhere Privatschule" in Windhoek, an der ich 1960 mein "Senior Certificate"-Examen ablegte. Im Anschluß daran nahm ich für ein Jahr teil an einem Studium generale des Leibniz-Kollegs der Universität Tübingen.

Im Frühjahr 1962 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität Bonn und legte noch im gleichen Jahr eine Ergänzungsprüfung - äquivalent zum deutschen Abitur - vor dem Kultusminister des Landes Nordrhein-Westfalen ab.
Mein Studium setzte ich 1965 an der Freien Universität in Berlin fort, an der ich im Frühjahr 1968 das Staatsexamen absolvierte.

Nach zweijähriger Tätigkeit als Medizinalassistent an Berliner Krankenanstalten erhielt ich im Mai 1970 vom Senator für Arbeit, Gesundheit und Soziales die Erlaubnis zur Ausübung des ärztlichen Berufes.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33, Garystr. 45